



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

DESARROLLO Y MADURACIÓN

DEL SISTEMA INMUNE DURANTE LA GESTACIÓN:

DETERMINACIÓN DE VALORES DE REFERENCIA.

TESIS DOCTORAL

Alicia-Carmen Pérez Arroyo

Madrid, 2008

Tesis doctoral

**DESARROLLO Y MADURACIÓN DEL SISTEMA INMUNE
DURANTE LA GESTACIÓN:
DETERMINACIÓN DE VALORES DE REFERENCIA.**

Esta Memoria ha sido presentada para optar al grado de Doctor en Biología Molecular
por la Licenciada:

Alicia-Carmen Pérez Arroyo.

Directora de Tesis:

Dra. M^a.Ángeles Muñoz-Fernández.

Doctora en Ciencias Biológicas.

Doctora en Medicina.

Adjunta del Laboratorio de Inmunobiología Molecular.

Hospital General Universitario “Gregorio Marañón” (Madrid).

Vº.Bº. La Directora.

Esta Memoria ha sido realizada en el Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular, del Hospital General Universitario “Gregorio Marañón”, bajo la dirección de la Dra. M^a.Ángeles Muñoz-Fernández. Esta Memoria ha sido realizada gracias a la financiación concedida por Nutribén, S.A., la Fundación Mutua Madrileña, el Fondo de Investigación Sanitaria, la Red de Investigación en Sida (RIS, Red Temática de Investigación Cooperativa Sanitaria ISCIII) y Caja Navarra.

“Cuando alguien desea realmente algo, el universo entero conspira para que lo logre.”

Paulo Coelho.

A mis padres.

Y a Marcos.

Agradecimientos

“SI CAMINAS SIEMPRE EN LA DIRECCIÓN DE TUS SUEÑOS,
CON SEGURIDAD SE TE CUMPLIRÁN TODOS”.

Esta frase, de “El Club de los Poetas Muertos” de N.H.Kleinbaum, resume mi vida para llegar a la investigación. Me ha costado mucho, pero siempre supe que esto era lo que quería hacer y por eso no dejé de caminar en esta dirección hasta llegar aquí. Sin embargo, avanzar solo/a es muy difícil; el camino se hace mejor si vas con alguien que te acompaña y te ayuda. Yo he tenido muchísima suerte, pues me he encontrado con gente verdaderamente increíble y a la que tengo mucho que agradecer.

Gracias a la Dra. M^a.Ángeles Muñoz-Fernández, por creer en mí y darme la oportunidad de trabajar en su grupo y cumplir mi sueño. Sin tu apoyo no habría sido posible. Gracias, gracias, gracias!!!.

Gracias a mis compañeros/as. Ellos/as son los/as que mejor entienden lo que significa llegar hasta aquí y los/as que más de cerca viven el esfuerzo que uno/a hace para lograrlo. Al “riquiño” de Louis, por ser, además, mi Amigo; Alberto, mi otro confidente; Nati, mi apoyo; Cristina, mi salvación en tantos momentos y en tantos sentidos!; Isabel, por quererme tanto; Coral, por comprenderme tan bien; Claudia, por essere così buona con me; Nick, por hacerme pensar en las cosas más insospechadas; Lola García, por cuidarme tanto; Susana, por escucharme tantas veces; Laura, por echarme una mano sobre todo al principio; Almudena, por hacerme reír siempre; Teresa, por contagiarme tu optimismo; Maribel, por animarme; Raquel, por tantas charlas al humo del cigarro; Chusa, por enseñarme; Pepa, por prestarle tu “ángel” a Marcos; José-Luis, por no negarme nunca nada; Rafa Gras, por tu sentido del humor; Jorge, por comprender mi parte “mística”; Luis López, por ser tan discreto. A las nuevas incorporaciones, a las que en poco tiempo he cogido un gran cariño: gracias a Verónica, por no haber cambiado nada desde que hicimos la carrera; a Carmen, por considerarme tu amiga; a Marjorie, por preguntarme cada día cómo estoy; a Rafa Correa, por ofrecerme tu ayuda; a Santi, por preocuparse de cómo estoy; a Almu del biobanco, por ser tan alegre; a Miguel, por querer ayudar siempre.

Gracias especialmente a José-M^a. Bellón, por su INESTIMABLE ayuda para la realización de esta Tesis. Eres grande, “chiquitín”!.

Gracias a la Dra. Lola Gurbindo, por facilitarme el trabajo.

Gracias al Dr. Ángel Aguarón y al personal de los paritorios, por implicarse en un proyecto de investigación.

Gracias al Dr. Manuel Leal y su grupo por su ayuda en parte de esta Tesis y, sobre todo, a Sara, por ser tan eficiente y tan especial, y a Marita y a Yolanda, por su ayuda en el último momento.

Gracias a los/as que alguna vez formaron parte del grupo y me ayudaron: Salva, Elena, Milagros, Jesús, Gerónimo y Arantza. Gracias a Heidi-Marie Binder, por su colaboración en una parte de este proyecto.

Gracias al Profesor Alessandro Plebani, por permitirme formar parte de su grupo y ser una más durante tres meses. Gracias al Dr. Vassi Lougaris y, sobre todo, a Giacomo Tampella, por dejarme aprender de él.

Gracias a Carmela, Susi, Maxi, Rosa, Nuria, Lara, Ruth y Silvia: sois uno de los motores de mi vida y no podría haber llegado hasta aquí sin vosotras. ¡OS QUIERO! Y gracias a Benito, Juan-Antonio, Mariano, Antonio, Fernando, Quique, Juan-Ra, Rafa y Andrés, por simplemente aceptarme como amiga. Y a todos “mis niños/as”, a los que quiero con locura, pero sobre todo a Marcos, el mayor ejemplo que he tenido nunca de que hay que luchar siempre y no tirar la toalla antes de tiempo.

A Cristina, por todos estos años de amistad y de apoyo continuo. A Asun, por estar ahí. Y, por supuesto, a Rosa que tanto me ha dado en estos años.

Grazie a Vincent, per essere così fiero di me.

Gracias a mis padres, lo que más quiero en este mundo, por ser como soy, por creer en mí siempre, por ayudarme tantísimo,...por quererme tantísimo. A mis hermanos, Dioni, Álvaro y Gemma, por su apoyo incondicional, y a mi cuñada Ana. Gracias también a mis “otras familias” (Pérez-Ávila y Sanromán-Huerga), por quererme y apoyarme tanto en incontables ocasiones.

GRACIAS A TODOS, por hacer posible todo lo que viene a continuación.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	8
ABREVIATURAS	13
SUMMARY	16
1. INTRODUCCIÓN.....	18
1.1. DESARROLLO DEL SISTEMA INMUNE FETAL.....	19
1.1.1. Desarrollo y diferenciación del linfocito T.....	20
1.1.2. Desarrollo y diferenciación del linfocito B.	24
1.1.3. Desarrollo de los linfocitos asesinos naturales o “natural killer”.....	28
1.1.4. Desarrollo de monocitos/macrófagos y células dendríticas.	29
1.2. LINFOPOYESIS POSNATAL.....	30
1.2.1. Linfocitos T y subpoblaciones de linfocitos T.....	30
1.2.2. Linfocitos B e inmunoglobulinas.	31
1.2.3. Linfocitos NK.....	33
1.2.4. Desarrollo de monocitos/macrófagos.....	33
1.2.5. Desarrollo de órganos linfáticos.....	33
1.3. INTERACCIONES ENTRE LAS CÉLULAS INMUNITARIAS	34
1.4. SISTEMA INMUNE NEONATAL.....	37
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	42
3. OBJETIVOS.....	44
4. SUJETOS DE ESTUDIO y MÉTODOS.....	47
4.1. SUJETOS DE ESTUDIO Y RECOGIDA DE MUESTRAS.	48
4.2. ESQUEMA DE TRABAJO Y METODOLOGÍA DEL ESTUDIO.	51
4.2.1. Cuantificación de subpoblaciones de linfocitos T CD4+, T CD8+, linfocitos B, células NK, mieloides, plasmacitoides y progenitores hematopoyéticos en sangre de cordón umbilical.....	52

4.2.2. Separación inmunomagnética de subpoblaciones celulares.....	54
4.2.2.1. Separación de monocitos CD14+.	54
4.2.2.2. Separación de linfocitos T CD4+.	55
4.2.2.3. Separación de linfocitos T CD8+.	55
4.2.2.4. Linfocitos B.	55
4.2.3. Cuantificación de inmunoglobulinas.....	56
4.2.4. Análisis de la variabilidad genética de la cadena H del receptor de células B (BCR-V _H).	56
4.2.5. Cuantificación del ratio δ TREC/ β TREC.....	57
4.2.6. Cuantificación de citocinas.	60
4.2.7. Análisis de la variabilidad genética de la cadena β del receptor de células T (TCR-V β).	60
4.2.8. Cultivos de proliferación celular.	61
4.2.9. Cultivo de monocitos CD14+.....	62
4.2.10. Análisis de marcadores de superficie de activación y adhesión en monocitos.	63
4.2.11. Cuantificación de citocinas en el sobrenadante de los cultivos de monocitos activados.....	64
4.2.12. Análisis de la expresión de CD14 y TLR4 en monocitos activados	65
4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	66
4.3.1. Análisis descriptivo de la población.....	66
4.3.2. Análisis estadístico de resultados.....	66
5. RESULTADOS	69
5.1. SUJETOS Y TIPO DE ESTUDIO.....	70
5.1.1. Características de las madres.....	70
5.1.2. Características de los neonatos.....	72

5.2. POBLACIONES CELULARES T, B y NK.....	76
5.3. CÉLULAS B.....	83
5.3.1. Subpoblaciones de células B.....	83
5.3.2. Inmunoglobulinas.....	87
5.3.3. Variabilidad del repertorio de células B: estudio del BCR-V _H	88
5.3.3.1. Verificación de la técnica.....	88
5.3.3.2. Expresión de subfamilias V _H	89
5.3.3.3. Clonalidad de subfamilias génicas V _H del BCR.....	92
5.3.3.3. Clonalidad de subfamilias génicas V _H del BCR.....	92
5.4. CÉLULAS T.....	95
5.4.1. Función tímica.....	95
5.4.1.1. Ratio δ TRECs / β TRECs.....	95
5.4.1.2. Interleucina-7.....	97
5.4.1.3. Linfopoyetina del estroma tímico.....	98
5.4.1.4. Variabilidad del repertorio de células T: estudio del TCR-V β	99
5.4.1.5. Análisis de subpoblaciones T inmaduras y virgen.....	104
5.4.2. Subpoblaciones de células T de memoria.....	110
5.5. CÉLULAS NK.....	115
5.6. CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	118
5.7. PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.....	120
5.8. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN.....	123
5.9. BALANCE Th1/Th2.....	124
5.10. MONOCITOS.....	127
5.10.1. Subpoblaciones de monocitos CD4+ en sangre total.....	127
5.10.2. Capacidad de presentación de antígeno y coestimulación en monocitos CD14+ activados.....	129

5.10.3. Marcadores de activación en monocitos CD14+.	131
5.10.4. Marcadores de adhesión en monocitos CD14+.	134
5.10.5. Producción de citocinas por monocitos CD14+ activados.....	136
5.10.5.1. Citocinas proinflamatorias.....	136
5.10.5.2. Inducción de una respuesta Th1: producción de IL-12(p40).....	138
5.10.5.3. Quimiotaxis: producción de TGF α	139
5.10.6. Diferencias en la ruta de TLR4.	140
6. DISCUSIÓN.....	142
CONCLUSIONES.....	169
BIBLIOGRAFÍA.	173
ANEXO	187

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Ag	Antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN total
BCR	<i>B-cell receptor</i> o receptor de células B
BCR-V _H	<i>Heavy-chain variable part</i> o parte variable de la cadena pesada (H) del BCR
BrdU	Bromo-deoxi-Uridina
CCDA	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CMSCUs	Células mononucleares de sangre de cordón umbilical
CMSPs	Células mononucleares de sangre periférica
Con A	Concavalina A
CPAs	Células presentadoras de antígeno
DMSO	Dimetil sulfoxido
EEM	Error estándar de la media
FCS	<i>Fetal calf serum</i> o suero de ternera fetal
HLA-DR	<i>Human leukocyte antigen -DR</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i> o molécula de adhesión intercelular
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IRF	Intensidad relativa de fluorescencia
KIRs	<i>Killing inhibitory receptors</i> o receptores inhibidores de la agresión
LPS	Lipopolisacárido
MdIF	Mediana de intensidad de fluorescencia

MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> o complejo principal de histocompatibilidad
MIF	Media de intensidad de fluorescencia
NK	<i>Natural killer</i> o asesinos naturales
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> o reacción en cadena de la polimerasa
PHA	<i>Phytohemagglutinin</i> o fitohemaglutinina
PWM	<i>Pokeweed mitogen</i>
RPM	Rotura prematura de membranas
RTEs	<i>Recent thymic emigrants</i> o emigrantes tímicos recientes
T _C	Linfocitos T citotóxicos
TCR	<i>T-cell receptor</i> o receptor de células T
TCR-V β	<i>β-chain variable part</i> o parte variable de la cadena β del TCR
TGF	<i>Tumor growth factor</i> o factor de crecimiento tumoral
T _H	Linfocitos T cooperadores o <i>helper</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor-4</i> o receptor tipo Toll -4
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> o factor de necrosis tumoral
TRECs	<i>T-cell receptor excision circles</i> o círculos de escisión del reordenamiento génico del receptor de células T
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i> o linfopoyetina del estroma tímico

SUMMARY

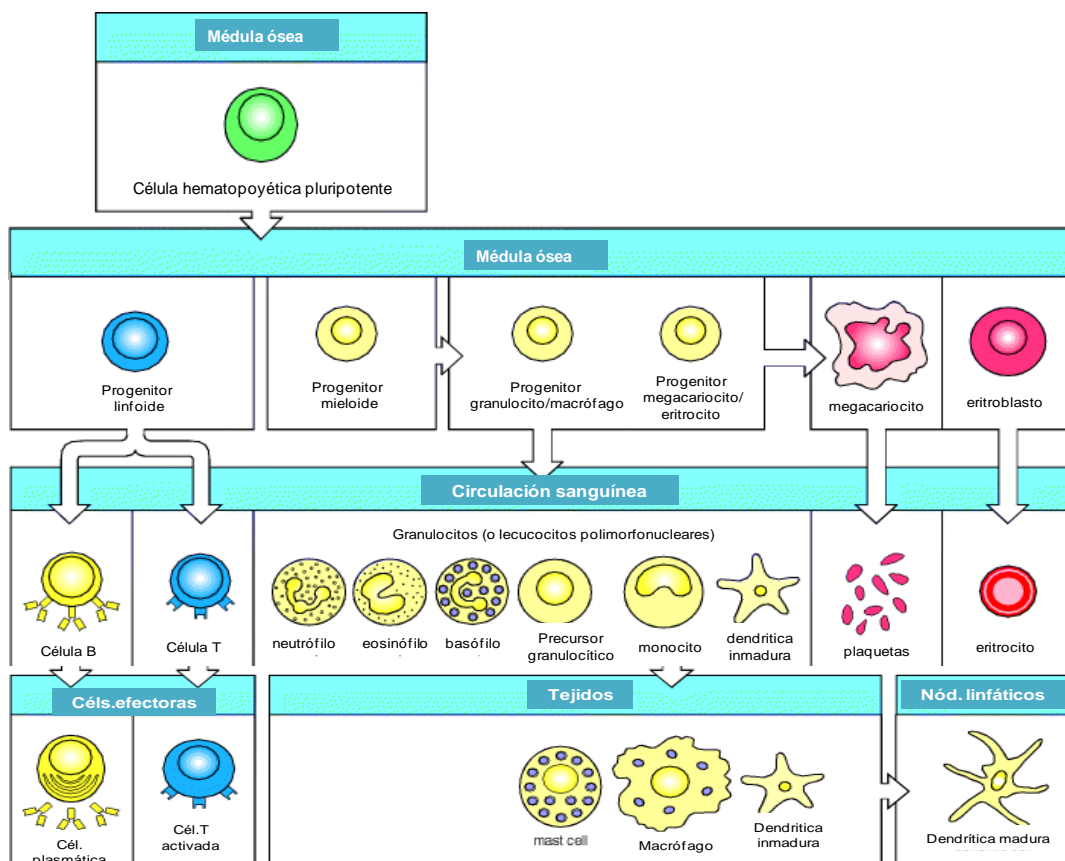
Neonates, especially those born at the *very preterm* period, are not fully immunocompetent because complete immune system maturation is not achieved prenatally and that might be likely the reason for the susceptibility to infections of this group of infants. Although there are several studies about differences in lymphocyte phenotype and function in healthy neonates, as compared with children and adults, little is known about the evolution of the immune system in neonates, from the *preterm* to the *full-term* period. Thus, a description of immunologic parameters and reference values of immune cell populations and subpopulations, humoral immunity or B-cell arm, thymic function or T-cell arm, cell proliferation properties, Th1/Th2 cytokine profile and innate immunity or monocytes, has been studied *week-to-week* of gestation and by gestational groups (*very preterm*, *preterm* and *full-term*) in cord blood of neonates born at different gestational ages. We performed a cross-sectional descriptive study in 183 healthy newborns (gestation age: 25 to 42 weeks) and quantified the relative and absolute counts of cell populations and subpopulations in umbilical cord blood, finding reference values for T-, B-, NK-, dendritic- and hematopoietic progenitor-cell subsets, *week-to-week* and by gestational groups. We also found an inversion between T CD4+ and NK cells from the *preterm* to the *full-term* period. The analysis of the evolution of cell supopulations showed that immature T cells had a variable quantity along the studied period, but naive, effector and activated memory T CD4+ and T CD8+ cells did not vary in that period. On the other hand, NK-cell subsets and antigen-presenting B cells increased, whereas immature CD5+ B cells and hematopoietic progenitor cells decreased with gestational age. We observed an impaired humoral function, as well as an antigen-presenting and co-stimulatory function of monocytes decreased in the *very-preterm* neonates. However, thymic function was complete at born, independently of gestational age. We also found a proinflammatory microenvironment in monocytes of *very-preterm* neonates, which could explain their major susceptibility to infections. In summary, with the results obtained here it could be optimize the care for neonates with complicated pregnancy and/or delivery, for the preterm neonates which immaturity make them very susceptible to infections and for those with immunodeficiencies acquired at birth.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DESARROLLO DEL SISTEMA INMUNE FETAL.

El sistema inmunitario humano surge en el embrión a partir del tejido asociado al tubo digestivo. Las células madre hematopoyéticas pluripotenciales aparecen por primera vez en el saco uterino a las 2,5-3 semanas de edad gestacional y emigran al hígado fetal en la 4ª-5ª semana de gestación, el cual se convierte en el sitio donde se produce la mayor parte de la hematopoyesis a las 5-6 semanas de gestación. De la 5ª-10ª semana de gestación, el hígado sufre un dramático incremento en su tamaño según aumenta el número de células nucleadas. Después, las células pluripotenciales residen en la médula ósea, donde permanecen durante toda la vida. Estos progenitores tempranos son capaces de proliferar, pero apenas son capaces de diferenciarse. Las células madre linfocitarias aparecen a partir de estas células precursoras y dan lugar a los linfocitos **T**, **B** o **NK** (*natural killer* o asesinos naturales), según los órganos o tejidos a los cuales se dirijan las células madre (*Figura 1.1*). El desarrollo de los órganos linfáticos primarios (timo y médula ósea) comienza en la mitad del primer trimestre de gestación y evoluciona con rapidez; los órganos linfáticos secundarios (bazo, ganglios linfáticos, amígdalas, placas de Peyer y lámina propia) se desarrollan poco después. Estos órganos continúan sirviendo de zonas de diferenciación de los linfocitos T, B y NK a partir de las células madre a lo largo de la vida. La organogénesis inicial y la diferenciación continua de células son consecuencia de la interacción de una gran cantidad de moléculas de superficie de las células linfocitarias (**CDs** o *clusters of differentiation*, que interactúan con otras moléculas de la superficie de otras células) y de moléculas ambientales y proteínas segregadas por las células implicadas (**citocinas**, con capacidad para actuar de forma autocrina, paracrina o endocrina para favorecer la diferenciación y proliferación de las células del sistema inmunitario) [1].

Figura 1.1. Desarrollo y maduración de los distintos linajes celulares de la sangre, a partir de progenitores hematopoyéticos.



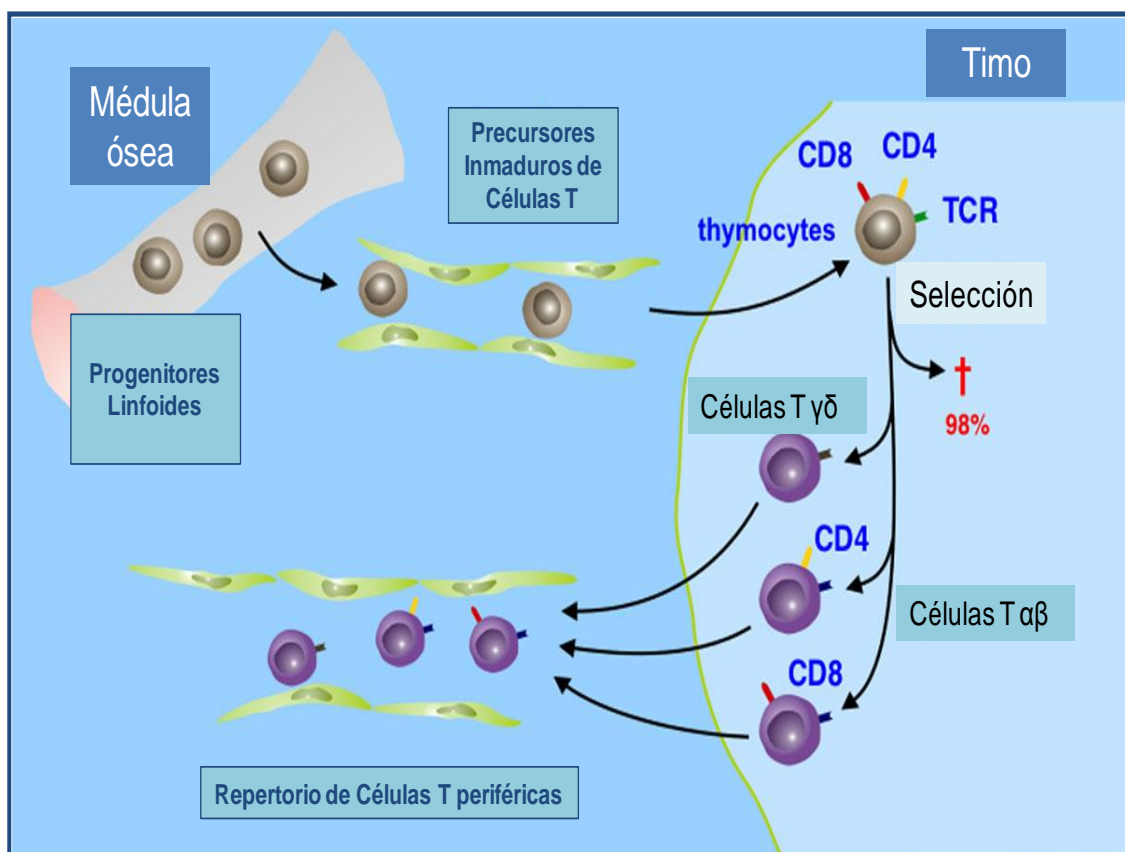
Fuente: Adaptada de “Immunobiology: the immune system in health and disease”. Part I. Chapter 1. Janeway *et al.* (2001). Garland Publishing.

1.1.1. DESARROLLO Y DIFERENCIACIÓN DEL LINFOCITO T.

El rudimento tímico primitivo se forma en el ectodermo de la tercera hendidura branquial y en el endodermo de la tercera bolsa branquial en la 4ª semana de gestación. Los rudimentos derecho e izquierdo se desplazan en sentido caudal en la 7ª-8ª semana y se fusionan en la línea media. Los precursores del linfocito T, vehiculizados por la sangre desde el hígado fetal (donde pueden identificarse en la 7ª semana), comienzan entonces a colonizar el mesénquima peritímico en la 8ª semana de gestación. Estas

células **pro-T** precursoras se identifican por las proteínas de superficie CD7 (marcador de linaje T que se encuentra en subpoblaciones T tempranas, que no expresan marcadores de células T más tardías como CD3, CD4 y CD8) y CD34 (marcador de progenitores hematopoyéticos), además de ser positivas para CD45 y CD3 citoplasmático; sin embargo, no expresan CD3 de membrana hasta después de la semana 10 de gestación, cuando las células proliferan menos [2, 3]. En la semana 8^a-8,5^a de gestación se encuentran células CD7+ dentro del timo, de las que el 60% son CD2+ (citoplásmico), sólo el 4% son CD3+ (citoplásmico) y ninguna son TCR δ o β positivas. Algunas células también expresan además CD4, proteína presente en la superficie de los linfocitos T cooperadores maduros (T_H o T *helper*), así como CD8, proteína que se encuentra en los linfocitos T citotóxicos maduros (T_C) y en el 30-40% de los linfocitos NK. Además, algunas células presentan cadenas aisladas (β , γ o δ) del receptor de células T (TCR o *T cell receptor*, T_i o T inmaduras), pero ninguna presenta un TCR completo. El reordenamiento de los genes del TCR implica el compromiso de las células pro-T a su desarrollo en la línea T, es decir, a convertirse en células **pre-T**. Este reordenamiento comienza poco después de la colonización del timo por las células madre y el establecimiento del repertorio de linfocitos T empieza a la 8^a-10^a semana de gestación. La reordenación del locus del TCR durante este proceso da lugar a la formación de episomas circulares de ADN o círculos de escisión, denominados TRECs (*T cell receptor excision circles*).

Figura 1.2. Esquema de la maduración y proceso de selección de los linfocitos T, según compartimentos.



Fuente: Adaptada de “Arthritis Research & Therapy”.

En la semana 9,5^a-10^a, más del 95% de los timocitos expresan CD7, CD2, CD4, CD8 y CD3c (citoplasmático), y alrededor del 30% portan el antígeno del timocito cortical interno CD1. En la 10^a semana, el 25% de los timocitos expresan el TCR $\alpha\beta$. Las células T $\alpha\beta$ aumentan gradualmente su número durante la vida embrionaria y representan más del 95% de los timocitos tras el nacimiento [4]. Entre las semanas 18 y 24 semanas, los nódulos linfáticos mesentéricos tienen un alto porcentaje de células T CD45RA⁺, pero muy pocas células B y muy pocos monocitos. El hígado fetal, en este periodo, tiene el mismo número de células T, células B y monocitos/macrófagos [5]. Sin embargo, las células T del bazo fetal contienen niveles similares a los de adultos de

CD3, CD4 y CD8, y también expresan CD2 y CD11a; por eso, el bazo es considerado plenamente inmunocompetente hacia las 18 semanas de gestación, teniendo la cantidad suficiente de células accesorias para asegurar la activación de las células T.

A medida que los **timocitos corticales inmaduros** comienzan a expresar TCR, tiene lugar el proceso de selección positiva y negativa [6, 7]. La **selección positiva** se produce mediante la interacción de los timocitos inmaduros (que expresan pocos TCR) con antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC o *major histocompatibility complex*) presentes en las células epiteliales tímicas corticales. Debido a ello, los timocitos con TCR capaz de interactuar con antígenos extraños presentados sobre antígenos propios del MHC se activan y maduran. Los **timocitos corticales maduros**, que sobreviven al proceso de selección, o bien expresan CD4 y están limitados a antígenos de la clase II del HLA propios, o bien expresan CD8 y están restringidos a antígenos propios de la clase I del HLA cuando interactúan con antígenos extraños presentados por estas moléculas del MHC [8]. La **selección negativa** tiene lugar después y está mediada por la interacción de los timocitos supervivientes, que expresan cantidades mucho mayores de TCR, con los péptidos propios del huésped presentados por los antígenos de la clase I ó II del HLA en los macrófagos tímicos derivados de la médula ósea, las células dendríticas y, posiblemente, los linfocitos B. Esta interacción media la **apoptosis** (o “muerte celular programada”) de estos timocitos autorreactivos [1]. A medida que tiene lugar el proceso de selección, el 97% de todos los timocitos corticales mueren. Las células supervivientes ya no tienen una doble positividad respecto del CD4 y el CD8, sino que presentan una u otra y, entonces, migran a la médula (*Figura 1.2*). Las funciones del linfocito T se adquieren junto al desarrollo de timocitos con una sola positividad, pero no están completamente

desarrollados hasta que las células emigran del timo. Se calcula que una célula madre da lugar a unos 3.000 **timocitos medulares maduros**.

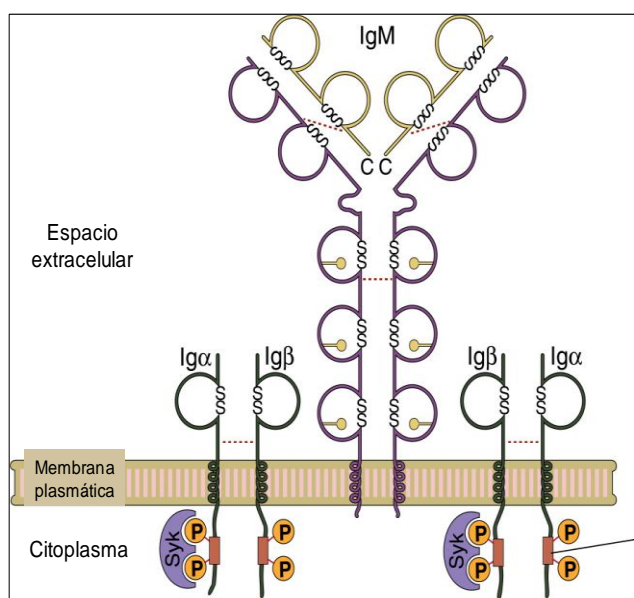
Los linfocitos T comienzan a emigrar del timo hasta el bazo, los ganglios linfáticos y el apéndice en la semana 11^a-12^a de la vida embrionaria y a las amígdalas en la semana 14^a-15^a. En los linfocitos T que acaban de salir del timo, llamados “emigrantes tímicos recientes” o RTEs (*recent thymic emigrants*), pueden detectarse los TRECs, mientras que los linfocitos T que se desarrollan fuera del timo no contienen estos episomas [9]. Los RTEs coexpresan las isoformas de CD45RA y CD62L (selectina L, molécula de adhesión de superficie linfocitaria que dirige la emigración selectiva de los linfocitos a los órganos linfáticos). Dejan el timo a través del torrente sanguíneo y se distribuyen por todo el cuerpo, con concentraciones más intensas en las áreas paracorticales de los ganglios linfáticos, las áreas perioarteriolares del bazo y el conducto linfático torácico.

1.1.2. DESARROLLO Y DIFERENCIACIÓN DEL LINFOCITO B.

En paralelo a la diferenciación del linfocito T, comienza el desarrollo del linfocito B en el hígado fetal antes de la 7^a semana de gestación. Las células madre CD34 del hígado fetal se siembran en la médula ósea de las clavículas en la 8^a semana de vida embrionaria y en la de los huesos largos en la 10^a semana. Se han definido **fases independientes del antígeno** del desarrollo del linfocito B [10] de acuerdo con las proteínas superficiales que expresan las células y con los patrones de reordenamiento de genes del receptor para el antígeno o “receptor de células B” (BCR o *B cell receptor*), la **inmunoglobulina (Ig)** (*Figura 1.3*). Existen cinco **isotipos** de inmunoglobulinas, IgM, IgG, IgA, IgD e IgE, que se definen por antígenos de cadena pesada específicos

presentes en cada una de ellas. La **IgG** y la **IgM**, los únicos isotipos fijadores del complemento, son las Ig más importantes de la sangre y de otros líquidos internos que nos protegen ante microorganismos infecciosos; la IgM se limita sobre todo al compartimento intravascular debido a su gran tamaño, mientras que la IgG está presente en todos los líquidos corporales internos. La **IgA** es la principal Ig protectora de las secreciones externas (es decir, de los aparatos gastrointestinal, respiratorio y urogenital), pero también está presente en el torrente sanguíneo. La **IgE**, que se encuentra en líquidos corporales internos y externos, participa en la defensa del huésped frente a los parásitos; pero, debido a los receptores de alta afinidad para la IgE presentes en los

Figura 1.3. Estructura de una inmunoglobulina, el receptor de células B para reconocimiento del antígeno.



Fuente: Adaptada de “Cellular and molecular immunology”. Abbas *et al.* (1999). W.B.Saunders.

basófilos y mastocitos, la IgE es el principal mediador de las reacciones alérgicas del tipo inmediato. Todavía no está clara la función de la **IgD**. Existen también **subclases de Ig** (de nuevo definidas por antígenos específicos de cadena pesada presentes en cada una de ellas, además de su antígeno de cadena específica de

clase): cuatro subclases de IgG (**IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4**) y dos subclases de IgA (**IgA1 e IgA2**), cada una de las cuales desempeña funciones biológicas diferentes.

La célula **pro-B** es la primera descendiente de la célula madre pluripotencial comprometida en la línea B y se detecta por la presencia de CD34 y CD10 en su superficie; en ella los genes de Ig permanecen en la línea germinal. La siguiente fase es la **pre-pre-B**, durante la cual los genes de Ig se reordenan pero no se expresan en el citoplasma cadenas pesadas μ ni IgM de superficie (IgMs); estas células se caracterizan por la coexpresión de CD34, CD10, CD19 y CD40 de membrana y, posteriormente, por la presencia adicional de CD73, CD22, CD24 y CD38. El siguiente estadio, la célula **pre-B** puede encontrarse en la 7ª semana de gestación y se distingue por la expresión de cadenas pesadas μ citoplasmáticas pero no de IgMs, porque todavía no se ha producido ninguna cadena ligera de Ig. También continúa expresando todos los antígenos CD de la fase anterior, excepto CD34 y CD10 (que se pierden); además, expresa CD21 [11]. Entre la 7ª y la 11ª semana se encuentra la fase de **célula B inmadura**, durante la cual se expresan IgMs e IgGs, porque se han reordenado los genes de las cadenas ligeras, pero no IgDs; se pierde CD38, pero persisten todos los otros antígenos CD de célula pre-B. La última fase de desarrollo del linfocito B que no depende del antígeno es la **célula B madura o virgen** que se encuentra hacia la 12ª-13ª semana de gestación y que coexpresa IgMs, IgDs e IgAs; también se adquiere CD23 en esta fase y todos los otros antígenos presentes en las células B inmaduras persisten. En la 14ª semana de vida embrionaria, el porcentaje de linfocitos circulantes que expresan IgMs e IgDs es el mismo que en la sangre del cordón y algo superior al de la sangre de los adultos.

Un feto humano comienza a recibir cantidades significativas de IgG materna a través de la placenta alrededor de la 12ª semana de gestación [12] y la cantidad aumenta de forma constante hasta que, en el nacimiento, la concentración sérica de IgG en el suero del cordón es comparable o superior a la materna. La IgG es la única clase que

atraviesa la placenta en un grado significativo; las cuatro subclases de IgG lo hacen, pero la IgG2 con menor eficacia. En el suero del cordón se encuentran cantidades pequeñas de IgM (10% de la concentración en adultos) y algunos nanogramos de IgA, IgD e IgE, que se cree tienen origen fetal debido a que ninguna de estas proteínas atraviesa la placenta. Se han observado IgM e IgE en abortos de tan sólo 10 semanas, e IgG ya a las 11-12 semanas. Estas observaciones plantean la posibilidad de que ciertos estímulos antigénicos atraviesen normalmente la placenta para provocar respuestas, incluso en fetos no infectados. Algunos lactantes atópicos tienen en ocasiones anticuerpos reagénicos frente a antígenos, como la clara del huevo, a los cuales no se han expuesto al menos de forma conocida durante la vida posnatal, lo que sugiere que la síntesis de estos anticuerpos IgE podría haberse inducido en el feto por antígenos ingeridos por la madre.

Los estadios **dependientes del antígeno** del desarrollo del linfocito B son los que se producen tras el estímulo de la célula B madura o virgen por un antígeno a través de su receptor para el antígeno (Igs); el resultado es la diferenciación de la célula y de su progenie en **linfocitos B memoria (CD27) Igs+** (para ese antígeno en particular) y de **células plasmáticas** que sintetizan y secretan Ig específicas del antígeno, es decir, **anticuerpos**. A pesar de la capacidad de los linfocitos B para dar lugar a células sintetizadoras y secretoras de Ig, las células plasmáticas no suelen encontrarse en los tejidos linfáticos del feto hasta la 20ª semana de gestación y luego aparecen muy rara vez, debido a que el útero constituye un ambiente estéril. Se han hallado placas de Peyer en un número significativo en el 5º mes de vida intrauterina y se han detectado células plasmáticas en la lámina propia en la 25ª semana de gestación. Antes del nacimiento

puede haber folículos primarios en los ganglios linfáticos, pero no suele haber folículos secundarios.

Aunque estas fases de desarrollo del linfocito B se han descrito en el contexto de la ontogenia de la célula B, es importante saber que a lo largo de la vida postnatal el desarrollo de linfocitos a partir de células madre pluripotenciales continúa.

1.1.3. DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS ASESINOS NATURALES O “NATURAL KILLER”.

La actividad “natural killer” (NK) comienza a la 8^a-11^a semana de gestación en células fetales hepáticas humanas. Los linfocitos NK también derivan de precursores de la médula ósea. No es necesario el procesamiento tímico para el desarrollo de los linfocitos NK, aunque estas células se han encontrado en el timo. Se definen por su capacidad funcional de mediar la citotoxicidad no restringida por el MHC (clásica). Las células NK también tienen receptores inhibidores de la agresión (KIRs) que reconocen ciertos antígenos MHC e inhiben la lisis de células alogénicas anormales en cuatro patrones específicos de reactividad [13]. El locus genético que controla estos patrones es diferente de los locus aloantigénicos del MHC tradicionales, aunque se ha situado en el cromosoma 6 en la región de los genes de la clase I del MHC. Al contrario que los linfocitos T y B, los NK no reordenan los genes de su receptor para el antígeno durante su desarrollo. Casi todos los linfocitos NK expresan CD56, y más del 90% expresa CD16 (FcγRIII) en su superficie celular. Otros antígenos CD que se encuentran en los linfocitos NK son el CD57 (en el 50-60%), el CD7 y el CD2 (70-90%) y el CD8 (30-40%). Tras su salida de la médula ósea, los linfocitos NK entran en la circulación o emigran hasta el bazo; hay muy pocos linfocitos NK en los ganglios linfáticos. En

sujetos normales, los NK representan el 10% de los linfocitos; este porcentaje es a menudo menor en la sangre de cordón.

1.1.4. DESARROLLO DE MONOCITOS/MACRÓFAGOS Y CÉLULAS DENDRÍTICAS.

Los monocitos/macrófagos son el primer tipo celular que aparece en la circulación fetal [14]. Se pueden distinguir dos poblaciones de células con una estructura monocítica, en el saco uterino a las 4-6 semanas, y en el hígado pre-hematopoyético hacia la 5ª semana de gestación. La población mayoritaria de macrófagos en el saco uterino es MHC-clase II(-); esta población también aparece en el córtex tímico, las zonas marginales de los nódulos linfáticos, la pulpa roja del bazo y en el medio de la actividad eritropoyética de la médula ósea [15]. Un número pequeño de células MHC-clase II(+) aparece en el hígado a las 7-8 semanas, en los nódulos linfáticos a las 11-13 semanas y en las áreas de células T de la médula tímica en desarrollo a las 16 semanas de gestación, mientras que el epitelio tímico expresa clase II a las 8-9 semanas [15]. Pero esta población que expresa clase II se encuentra también en los sistemas hepáticos (células de Kupffer o macrófagos sinusoidales hepáticos), aunque el número es bajo y se incrementa hasta niveles de adulto en el periodo neonatal.

En la piel, las células de Langerhans HLA-DR+ se detectan hacia las semanas 6-7, periodo en el que la densidad de dichas células es similar pero son más pequeñas y de un fenotipo mucho más heterogéneo que en estadíos más avanzados de la gestación. Las células de Langerhans migran dentro de la epidermis durante el primer trimestre y alcanzan un fenotipo adulto en el segundo trimestre [16].

Los monocitos circulantes aparecen por primera vez en la sangre fetal en las semanas 18-20 de gestación. Alrededor de la semana 30 de gestación, la cantidad de monocitos aumentan del 3% al 7% de las células sanguíneas circulantes, y en el momento del nacimiento su concentración supera los 500/mm³, un valor muy superior al de la mayoría de los adultos [17]. Cuando los monocitos circulantes migran a algún tejido se diferencian a macrófagos mononucleares.

1.2. LINFOPOYESIS POSNATAL. [1]

1.2.1. LINFOCITOS T Y SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T.

Aunque el porcentaje de linfocitos T CD3 en la sangre del cordón es algo menor que en la sangre periférica de los niños y los adultos, los linfocitos T están presentes en un número absoluto (células/mm³) más elevado debido a que el número de linfocitos totales es más alto en todos los lactantes normales. Además, el cociente entre los linfocitos CD4 y CD8 suele ser mayor en la sangre de cordón (3,5-4:1) que en la sangre de los niños y los adultos (1,5-2:1). Casi todos los linfocitos T de la sangre del cordón expresan la isoforma CD45RA (virgen) y persiste un predominio de linfocitos CD45RA sobre los CD45RO durante los 2-3 primeros años de vida; después, el número de células que expresan estas dos isoformas se igualan de forma gradual [18, 19].

Los linfocitos T de la sangre del cordón pueden responder normalmente a mitógenos de linfocito T, PHA (*phytohemagglutinin* o fitohemaglutinina) y Con A (conavalina A), y son capaces de montar una respuesta leucocitaria mixta normal. Los recién nacidos a término también tienen la capacidad de desarrollar respuestas de linfocitos T específicos frente al antígeno desde el nacimiento, como se demuestra por

una reactividad fuerte a la tuberculina pocas semanas después de la vacunación con BCG [20], incluso cuando se administra el primer día de vida.

1.2.2. LINFOCITOS B E INMUNOGLOBULINAS.

Los linfocitos B están presentes en la sangre del cordón en porcentajes algo superiores pero en un número absoluto considerablemente mayor que en la sangre de los niños y los adultos, por el mayor recuento absoluto de linfocitos en todos los lactantes normales. Sin embargo, los linfocitos B de la sangre del cordón no sintetizan la amplia variedad de isotipos de Ig que llevan a cabo los linfocitos B de los niños y los adultos cuando se les estimula con el mitógeno de *Phytolacca americana* (PWM) o anti-CD40 más IL-4 o IL-10; por el contrario, producen sobre todo IgM pero en una cantidad mucho menor. Debido a la falta de anticuerpos IgM (**opsoninas termoestables**) frente a microorganismos gramnegativos, los neonatos tienen una mayor susceptibilidad a las infecciones por estos patógenos y probablemente esto hace que los polimorfonucleares neonatales no fagociten bien algunos microorganismos. Los anticuerpos IgG transmitidos desde la madre sirven de manera adecuada como opsoninas termoestables para la mayoría de las bacterias grampositivas, y los anticuerpos IgG frente a los virus aportan una protección eficaz. Dado que los lactantes prematuros han recibido menos IgG materna en el momento del nacimiento que los lactantes a término, la actividad opsonizadora del suero es más baja en estos neonatos.

Los neonatos comienzan a sintetizar anticuerpos de la clase IgM a una gran velocidad, inmediatamente después del nacimiento en respuesta al inmenso estímulo antigénico de su nuevo ambiente. Este aumento continúa hasta conseguir las concentraciones del adulto alrededor del primer año de edad. El suero del cordón del

neonato normal no infectado no contiene IgA detectable, detectándose IgA sérica por primera vez alrededor del 13° día de la vida postnatal y su concentración aumenta de manera gradual durante la primera parte de la infancia hasta conseguir las concentraciones del adulto entre el 6° y el 7° años de vida. La sangre del cordón contiene concentraciones de IgG comparables o mayores a las del suero materno. La IgG materna desaparece gradualmente durante los primeros 6-8 meses de vida, mientras aumenta la síntesis de IgG por parte del niño hasta conseguir la concentración de IgG total del adulto alrededor de los 7-8 años de edad. El desarrollo de la IgE en general sigue al de la IgA. La concentración total de Ig en lactantes suele alcanzar su nivel más bajo alrededor del 3°-4° mes después del nacimiento. Después de alcanzarse las concentraciones del adulto de todas las Ig, estos valores permanecen constantes para un sujeto normal. La capacidad de producir anticuerpos específicos frente a antígenos proteicos se encuentra intacta en el momento del nacimiento. Sin embargo, los lactantes normales no pueden producir anticuerpos frente a antígenos polisacáridos hasta pasados los 2 años de edad, a no ser que el polisacárido esté conjugado con un transportador proteico, como es el caso de las vacunas conjugadas de *Haemophilus influenzae* del tipo b (Hib) y de *Streptococcus pneumoniae*.

Los linfocitos B CD5+ (células B-1) se encuentran en un porcentaje mayor en la circulación fetal que en la adulta, pero disminuye con el aumento de la edad gestacional. Sin embargo, en el momento del nacimiento la mayor parte de las células B son CD5+, en contraste con el adulto en el que sólo un pequeño porcentaje de las células B periféricas expresan esta molécula [21, 22]. Las células B CD5+ son independientes de las células T y producen anticuerpos polirreactivos que tienen un papel importante en la

respuesta inmune primaria y son muy útiles en la primera línea de defensa, tan necesaria en el neonato [23].

1.2.3. LINFOCITOS NK.

El porcentaje de linfocitos NK en la sangre del cordón suele ser menor que en la sangre de los niños y adultos, pero el número absoluto de linfocitos NK es aproximadamente el mismo debido al mayor número de linfocitos. La capacidad de los linfocitos NK de la sangre del cordón de mediar la lisis de las dianas en análisis de los linfocitos NK o análisis de *citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos* (CCDA) es alrededor de dos tercios la de los adultos.

1.2.4. DESARROLLO DE MONOCITOS/MACRÓFAGOS.

El número de monocitos circulantes en neonatos a término es similar al de adultos, pero tienen menos macrófagos tisulares. Esto parece deberse a una menor infiltración de monocitos en los sitios de inflamación en el recién nacido [24]. El número de macrófagos tisulares no alcanzan los niveles adultos hasta los 6-10 años de vida. Aunque la capacidad fagocítica y la de procesamiento del antígeno de macrófagos neonatales y adultos son similares, las células neonatales tienen una capacidad relativamente disminuída para producir y responder a varias citocinas [25].

1.2.5. DESARROLLO DE ÓRGANOS LINFÁTICOS.

El tejido linfático es en proporción pequeño pero está bien desarrollado en el nacimiento y madura con rapidez en el periodo posnatal. El timo es más grande respecto del tamaño del cuerpo durante la vida fetal y en el momento del nacimiento suele tener dos tercios de su peso maduro, que alcanza durante el primer año de vida. No obstante, alcanza una masa máxima justo antes de la pubertad y después involuciona de manera

gradual (*Figura 1.4*). Al año de edad, todas las estructuras linfáticas están maduras desde el punto de vista histológico. Los recuentos absolutos de linfocitos en la sangre periférica también alcanzan un máximo durante el primer año de vida. El tejido linfático periférico aumenta con rapidez su masa durante la lactancia y primera parte de la infancia.

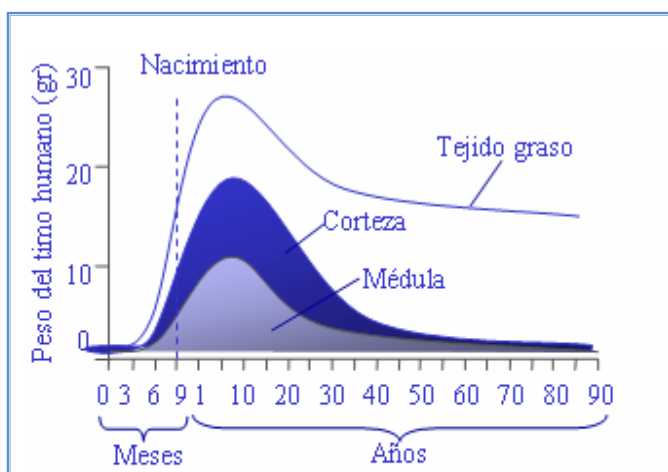


Figura 1.4. Evolución de la masa del timo durante el periodo fetal, infancia y periodo adulto en humanos. *Fuente:* "Inmunología". J. Peña Martínez. Cap.2. "Células inmunocompetentes". C. Alonso y J. Peña.

Alcanza el tamaño del adulto a los 6 años de edad, supera estas dimensiones durante los años prepuberales y después sufre una involución coincidente con la pubertad. Pero el bazo aumenta gradualmente su masa durante la maduración y no alcanza su peso completo hasta la fase adulta. El número medio de placas de Peyer en el nacimiento es la mitad que en la fase adulta y aumenta en forma gradual hasta que el número medio del adulto se supera durante los años de la adolescencia.

1.3. INTERACCIONES ENTRE LAS CÉLULAS INMUNITARIAS.[1, 26]

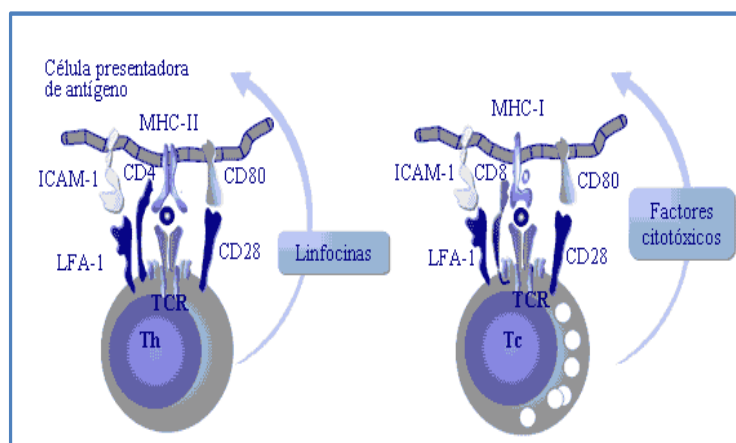
Al contrario que el receptor para el antígeno del linfocito B (Ig), que puede reconocer antígenos sin procesar, el TCR sólo reconoce péptidos antigénicos procesados y presentados a él por moléculas del MHC (clase I -HLA A, B y C- que se encuentran en la mayoría de las células nucleadas, y clase II -HLA DR, DP y DQ- que están

presentes en macrófagos, células dendríticas y linfocitos B), en **células presentadoras de antígeno (CPAs)**. Las moléculas del MHC tienen una hendidura en su estructura proteica que se ajusta a los péptidos. Los péptidos que se hallan en el surco de las moléculas de la clase I del HLA proceden de proteínas sintetizadas normalmente en la célula y que se degradan e introducen en la hendidura. Los péptidos presentes en la hendidura de las moléculas de la clase II proceden de antígenos exógenos naturales, como las vacunas o las proteínas bacterianas. Estas proteínas son captadas por las CPAs (macrófagos, células dendríticas y linfocitos B), se degradan y se expresan en la superficie celular dentro de la hendidura de las moléculas del HLA de la clase II. El TCR interactúa entonces con la molécula del HLA que transporta el péptido y, a través de su enlace funcional y físico con el complejo CD3 de las moléculas transductoras de señales, envía una señal al linfocito T para que produzca citocinas que finalmente dan lugar a la activación y proliferación del linfocito T.

Dos de las principales funciones de los linfocitos T son: 1) enviar señales a los linfocitos B para que sinteticen anticuerpos, mediante la producción de citocinas y moléculas de membrana que pueden servir como ligandos para moléculas superficiales del linfocito B, y 2) matar las células infectadas por virus o las células tumorales. Para que un linfocito T desempeñe cualquiera de estas funciones debe primero unirse a una CPA o una célula diana. Para que esta unión sea de alta afinidad, varias moléculas de los linfocitos T, además del TCR, se adosan a las moléculas de las CPAs o las células diana: CD4 de los linfocitos T_H se une a las moléculas de la clase II del MHC en las CPA; CD8 de los linfocitos T_C se une a la molécula de la clase I del MHC en la célula diana; LFA-1 del linfocito T se une a ICAM-1 (CD54) o molécula de adhesión intercelular-1 en las CPAs; CD2 en los linfocitos T se une a LFA-3 (CD58) en las

CPAs. La adhesión de los linfocitos T a las CPAs estimula a los linfocitos T_H para que produzcan interleucinas y aumenten la expresión en su superficie de moléculas como el ligando de CD40 (CD154), que ayuda a los linfocitos B y a los linfocitos T_C a destruir sus objetivos (*Figura 1.5*).

Figura 1.5. Presentación del antígeno por moléculas del MHC tipo I a linfocitos T citotóxicos o $CD8^+$ y tipo II a linfocitos T *helper* o $CD4^+$.
Fuente: “Inmunología”. J. Peña Martínez. Cap.2. “Células inmunocompetentes”. C. Alonso y J. Peña.



En la *respuesta primaria de anticuerpos*, el antígeno original es transportado hasta un ganglio linfático de drenaje, es captado por células especializadas llamadas **células dendríticas foliculares** (CDFs) y se expresa en su superficie. Los linfocitos B vírgenes que expresan Igs específica frente a ese antígeno se unen entonces al antígeno presente en la superficie de las CDFs, que, junto con otras señales producidas por las citocinas que secretan los linfocitos T_H activados y las de la molécula CD154 de la superficie del linfocito T que se une al CD40 de la superficie del linfocito B, hace que el linfocito B evolucione hacia una célula plasmática productora de anticuerpos. En la respuesta inmunitaria primaria sólo suelen producirse anticuerpos IgM, y la mayoría de ellos con una afinidad relativamente baja. Algunos linfocitos B se convierten en linfocitos B de memoria durante la respuesta inmunitaria primaria. Estas células cambian sus genes de inmunoglobulina de forma que sintetizan anticuerpos IgG, IgA e

IgE con una mayor afinidad ante la exposición secundaria al mismo antígeno. La *respuesta inmunitaria secundaria* se produce cuando estos linfocitos B de memoria se encuentran otra vez con el antígeno. Se forman de nuevo células plasmáticas igual que en la respuesta primaria, pero se generan muchas más células y con mayor rapidez y se sintetizan anticuerpos IgG, IgA e IgE. Además, los cambios genéticos en los genes de inmunoglobulinas (mutación somática) aumentan la afinidad de estos anticuerpos. El patrón exacto de respuesta de isotipo frente al antígeno varía según el tipo de antígeno y las citocinas presentes en el microambiente.

Para las lisis mediadas por los linfocitos NK, la unión de éstos a sus objetivos está facilitada por las interacciones LFA-1-ICAM. El CD56 o NCAM (moléculas de adhesión de células nerviosas) también media la adhesión homotípica de los linfocitos NK. El FcγRIII, o receptor de baja afinidad de la IgG, permite a los linfocitos NK mediar también la *citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos* (CCDA). En esta reacción, el anticuerpo se une al FcγRIII a través de su región Fc y la porción combinante de la IgG se une a la diana, facilitando que el linfocito NK mate a la célula diana.

1.4. SISTEMA INMUNE NEONATAL.

En los últimos años, la comprensión del sistema inmune y de los mecanismos de defensa en individuos adultos ha avanzado rápida y significativamente. Sin embargo, todavía existen grandes incógnitas acerca del desarrollo inmunobiológico durante el periodo gestacional y postnatal.

El primer acercamiento a la inmunología del recién nacido parte del conocimiento que se tiene de este sistema en la edad adulta, después pediátrica y

finalmente neonatal. En cada periodo, se han descrito diferencias importantes, conforme nos acercamos a la fecha de nacimiento, basadas en la inmadurez tanto fenotípica como funcional del sistema inmune neonatal. Estas diferencias a nivel celular existentes entre los neonatos y los adultos dan cuenta de la inmadurez del sistema inmune del recién nacido y de los cambios que, durante el desarrollo, darán lugar a un sistema inmune adulto. Sin embargo, estas diferencias no deben ser consideradas como deficiencia: neonatos y niños sanos son inmunocompetentes, pero debido al estado virgen de su sistema inmune, reaccionan de manera diferente frente a antígenos y son menos eficientes ante ciertos patógenos, por lo que son más susceptibles a infecciones [27].

Aunque no está bien definido el momento de la gestación en el que el embrión humano comienza a desarrollar un sistema inmune competente, múltiples trasplantes intraútero sitúan dicho período por encima de las 20-24 semanas de gestación. Los estudios humanos anteriores a este período, e inclusive a lo largo del embarazo, han quedado limitados a la posibilidad de acceder al feto, dado el riesgo que presentan las técnicas invasivas (amniocentesis, cordocentesis), por lo que el conocimiento que se tiene de la fisiología inmunológica durante la gestación es escaso. Esta limitación se suple con el uso de sangre de cordón umbilical, recogida en el momento del parto, aunque en la mayoría de los casos se trata de sangre de cordón de neonatos nacidos *a término*, es decir, de más de 37 semanas de gestación.

A pesar de que los neonatos tienen un sistema celular inmunológico completo en el nacimiento y se detectan anticuerpos en mucosas tras el primer mes de vida en el 97% de la población normal [28], dicho sistema madura gradualmente durante el primer año de vida. Los recién nacidos tienen la función inmune B incompleta, deficiencias en la presentación antigénica por células dendríticas y una limitada proliferación de linfocitos

T [29]. Los valores de células T en bazo son 1000 veces más bajos que en adultos, poco después del nacimiento, lo cual sugiere que el sistema inmune inmaduro puede ser sobrepasado por una infección viral o por vacunas virales vivas (las células T son necesarias para el aclaramiento viral) [30]. Además, existe una disminuida producción de citocinas tipo Th1, por lo que las respuestas celulares en el neonato son predominantemente de tipo Th2. Esto implica que las células T no son reclutadas y que no se realiza el aclaramiento viral.

En los trabajos de varios autores, en los que se ha utilizado citometría de flujo, se han remarcado características diferenciales fundamentalmente en el fenotipo de las subpoblaciones linfocitarias de recién nacidos sanos, niños y adultos [27, 31-33] [34], así como niveles reducidos de la función linfocitaria [35]. Por esto, el inmunofenotipaje de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y los ensayos de función linfocítica, son herramientas importantes en el diagnóstico y seguimiento de niños con inmunodeficiencias y otros desórdenes inmunológicos, tanto congénitos como adquiridos, pero es necesario un conocimiento del desarrollo normal del sistema inmune durante la gestación y los primeros años de vida para la correcta interpretación de los resultados obtenidos en dichos pacientes. Estos análisis detallados se pueden llevar a cabo a partir de **sangre de cordón umbilical**, que se puede obtener en grandes cantidades en el momento del parto y no supone una invasión a la integridad del neonato.

También, a nivel de órgano linfoide, existen estadíos durante la vida del individuo. Así, el timo supone un órgano esencial en la generación de las células T durante el periodo fetal y los primeros años de vida, para después, en el adulto, ir sufriendo una involución. Es importante conocer el desarrollo de la función tímica en el

neonato y de la capacidad para generar nuevas células, propiedad que puede medirse a través de los TRECs [9] y que puede verse favorecida por la acción de las citocinas del estroma tímico, interleucina-7 (IL-7) y linfopoyetina del estroma tímico (TSLP o *thymic stromal lymphopoietin*).

Las infecciones son, con frecuencia, una causa importante de morbilidad y mortalidad en el periodo neonatal. Aproximadamente, el 2% de los fetos se infectan en el útero y algo más del 10% de los niños se infectan durante el primer mes de vida. La sepsis neonatal constituye la causa más frecuente de muerte en los recién nacidos prematuros, a pesar del diagnóstico de las distintas entidades mórbidas.

El factor neonatal más importante que predispone a la infección es la prematuridad y/o el bajo peso al nacer. Este nuevo grupo de niños no está, en general, suficientemente desarrollado para enfrentarse con el entorno extrauterino sin asistencia, debido a que su inmadurez los predispone, entre 3 y 10 veces más, a sufrir un mayor riesgo de infecciones. Además, el subdesarrollo de su sistema inmune y de sus defensas compromete severamente su habilidad para producir anticuerpos y montar una respuesta inmune protectora y específica. Estos niños pre-término también tienden a tener bajos valores de IgG materna, comparados con los niños nacidos a término, lo que les deja vulnerables frente a los efectos de muchos agentes infecciosos. En estos niños prematuros, es esencial encontrar la manera efectiva de aumentar o acelerar el desarrollo de su sistema inmune; pero para esto se requiere un entendimiento básico de cómo y cuándo se desarrollan los componentes del sistema inmune, así como los elementos claves (celulares, moleculares y genéticos) y los mecanismos que conducen a su desarrollo secuencial.

El aumento de la prematuridad es debido sobre todo al incremento de los más prematuros, es decir, a los menores de 1.500 g. de peso y, dentro de ellos, a los llamados de “extremadamente bajo peso al nacer” o niños que nacen con pesos inferiores a 1.000 g.

La prematuridad se ha convertido en la primera causa de morbimortalidad perinatal, siendo, para aquellos recién nacidos con edad gestacional ≤ 28 semanas, 426 veces mayor el riesgo relativo de muerte neonatal precoz, en comparación a los nacidos a término. Junto con la disminución de la edad gestacional, la disminución del peso del recién nacido se relaciona con un incremento de la tasa de mortalidad y morbilidad perinatal [36] [37].

En esta Memoria se hace un análisis detallado de las características del sistema inmune del neonato en función de la edad gestacional, en el que se estudian semana a semana distintas características del sistema inmune y se establecen diferencias o equivalencias entre distintas edades gestacionales, con el propósito de acercarnos al periodo intrauterino o gestacional, y en el que se utiliza la metodología más adecuada en cada momento.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las diferencias fenotípicas y funcionales a nivel celular existentes entre los neonatos y los adultos, que dan cuenta de la inmadurez del sistema inmune del recién nacido y de los cambios que, durante el desarrollo, darán lugar a un sistema inmune adulto, no deben ser considerados como deficiencia: recién nacidos y niños sanos son inmunocompetentes, pero debido al estado *virgen* de su sistema inmune, reaccionan de manera diferente frente a antígenos y son menos eficientes ante ciertos patógenos, por lo que son más susceptibles a infecciones [27].

Por ello, es esencial un entendimiento básico de cómo y cuándo se desarrollan los componentes del sistema inmune, así como los elementos claves (celulares, moleculares y genéticos) y los mecanismos que conducen a su desarrollo secuencial, para averiguar las diferencias que hacen a un neonato *a término* más preparado inmunológicamente que un neonato *pretérmino*.

En esta Memoria, investigamos las distintas características del sistema inmune del neonato en función de las distintas edades gestacionales, inclusive aquéllas que se acercan a la viabilidad fetal (edad gestacional <28 semanas), con el propósito de acercarnos al período intrauterino. De esta forma, conoceremos mejor el sistema inmune neonatal y podremos determinar qué sucede en el sistema inmune de niños recién nacidos con infecciones congénitas o con infección post-natal y para potenciar su respuesta inmune.

3.OBJETIVOS

3.1. Objetivo principal:

Estudiar el desarrollo y maduración del sistema inmune en neonatos sanos teniendo en cuenta la edad gestacional y/o peso del neonato al nacer, determinando los distintos parámetros inmunológicos *semana a semana* durante la gestación.

3.2. Objetivos concretos:

1. Analizar las subpoblaciones linfocitarias T, B, y NK, células de origen mieloide y plasmacitoide, y precursores hematopoyéticos y determinar los *valores de referencia* y la evolución de cada población y subpoblación celular, *semana a semana* en neonatos de distintas semanas gestacionales.
2. Estudiar el brazo humoral de la respuesta inmune en neonatos de distintas edades gestacionales, mediante el estudio de las subpoblaciones de células B en sangre de cordón umbilical, así como la producción de inmunoglobulinas en plasma de sangre de cordón umbilical y la variabilidad de la cadena H (pesada) del receptor de células B (BCR-V_H) de cordón umbilical.
3. Investigar la función tímica de neonatos de diferentes semanas de gestación, mediante el estudio de subpoblaciones de células T virgen, la proliferación intratímica a través del ratio sjTREC/βTREC y la producción de las citocinas IL-7 y TSLP, así como variabilidad de la cadena β del receptor de células T (TCR-Vβ) en los linfocitos de la sangre del cordón umbilical.
4. Estudiar la proliferación celular a distintos estímulos por parte de las células mononucleares de la sangre del cordón umbilical de neonatos de distintas semanas gestacionales.

5. Analizar el perfil Th1/Th2 de citocinas en el plasma de la sangre de cordón umbilical procedente de neonatos nacidos en diferentes semanas gestacionales.
6. Estudiar la capacidad de presentación antigénica, coestimulación, activación y adhesión de los monocitos de neonatos de distintas semanas de gestación, mediante el análisis de marcadores de la superficie celular, la cuantificación de distintas citocinas en el sobrenadante de los cultivos y la expresión de los receptores CD14 y TLR4, de los monocitos estimulados procedentes de sangre de cordón umbilical.

4. SUJETOS DE ESTUDIO Y MÉTODOS

4.1. SUJETOS DE ESTUDIO Y RECOGIDA DE MUESTRAS.

Se realizó un estudio transversal descriptivo en **183** neonatos, distribuidos por semanas de gestación (*semana a semana*), desde la semana 25 hasta la semana 42 de gestación, y por grupos gestacionales, desde neonatos *muy pretérmino* o ≤ 30 semanas de gestación, neonatos *pretérmino* o 31-36 semanas y neonatos *a término* o ≥ 37 semanas de gestación (*Figura 4.1*). Sin embargo, según las características de cada uno de los objetivos planteados en esta Memoria, los análisis se realizaron en un número diferente de neonatos.

Los *criterios de inclusión* fueron:

- Neonatos sanos, nacidos de madres sin antecedentes patológicos y controladas en el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital General Universitario “Gregorio Marañón” de Madrid y del Hospital “Virgen de Rocío” de Sevilla.

Los *criterios de exclusión* fueron los siguientes:

- Para las madres: antecedentes patológicos; control inadecuado de la gestación; estar bajo tratamiento farmacológico; ser fumadoras; sospecha de infección subyacente al ingreso; rotura de membrana > 24 h.; fiebre intraparto; inducción del parto con prostaglandina E; cultivo vaginal positivo para SB-A.

- Para los neonatos: defecto congénito y/o adquirido; que hubiesen recibido una transfusión de leucocitos o granulocitos; que hubiesen recibido corticoides sistémicos; con padres que vivieran fuera del área de referencia del Hospital; con pérdida del *bienestar fetal*.

La recogida de muestras se realizó principalmente a través del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Materno-Infantil del Gregorio Marañón

(Madrid), estableciéndose una estrecha colaboración con todo el personal de los paritorios, tanto matronas como auxiliares, para la inclusión del neonato en el estudio. También se estableció una colaboración con el Hospital Materno-Infantil del Virgen del Rocío (Sevilla) para la inclusión de neonatos en el estudio. En cada parto se recogieron de 15 a 20 mL. de **sangre de cordón umbilical**, mediante venopunción del cordón umbilical inmediatamente después de clamarlo [38] y se rellenó la ficha descrita en la *Tabla 4.1*. El objetivo fue conocer la historia clínica de la madre o las posibles complicaciones que pudieran producirse en el momento del parto, para incluir o excluir la muestra del estudio. Esta Memoria se ha basado en un proyecto de investigación que pasó el Comité de Ética de la Investigación Clínica del HGUGM . Aunque las muestras se anonimizaron, se solicitó un consentimiento informado firmado por los padres, para la inclusión del neonato en el estudio.

Figura 4.1. Diagrama de semanas y grupos gestacionales comprendidos en el estudio.

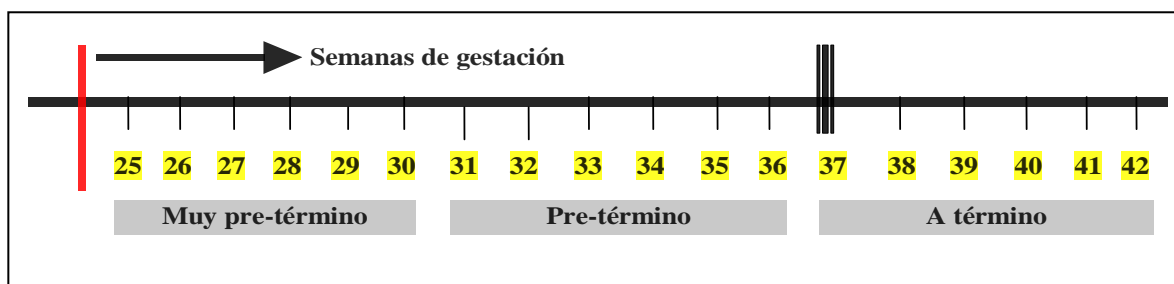


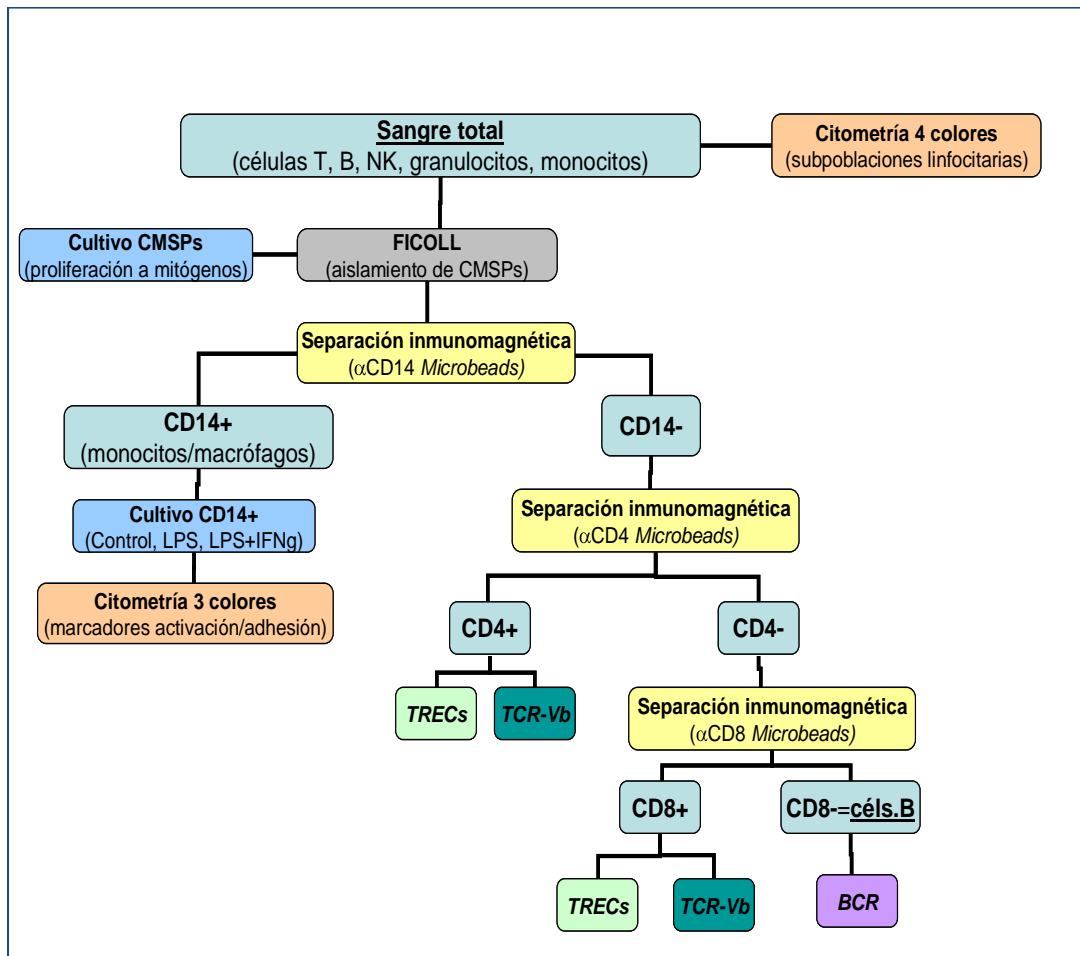
Tabla 4.1. Ficha materno-fetal, donde aparecen todos los datos relativos a la madre, al neonato y al parto.

DATOS DE LA FICHA MATERNO FETAL			EDAD GESTACIONAL		
Número de historia de la madre.					
Nombre y Apellidos de la madre.					
Fecha de parto			Edad		
Tipo de gestación			Paridad		
Grupo sanguíneo de la madre					
Se garantiza la carencia de antecedentes patológicos			Si / No		
Personales	Si / No				
Familiares	Si / No				
Obstétricos	Si / No				
Tóxicos	Si / No				
Cultivo vaginal negativo	Si / No				
Se garantiza el control adecuado de la gestación			Si / No		
Se han utilizado fármacos ajenos a la historia natural del			Si / No		
Inducción	Si / No		Tipo de anestesia		
Motivo de inducción			Tipo de		
Fármaco utilizado para la inducción			Tiempo de RPM		
Sexo			Apgar al 1°		
Peso			Apgar al 5°		
PH			N° Laboratorio		

4.2. ESQUEMA DE TRABAJO Y METODOLOGÍA DEL ESTUDIO.

El esquema de trabajo para el procesamiento de las muestras fue el que muestra la *Figura 4.2*.

Figura 4.2. Esquema del procesamiento de las muestras, con el detalle de las técnicas de laboratorio empleadas para cada parte del estudio.



4.2.1. CUANTIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD4+, T CD8+, LINFOCITOS B, CÉLULAS NK, MIELOIDES, PLASMACITOIDES Y PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS EN SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL.

El análisis de las subpoblaciones linfocitarias se realizó por citometría de flujo en sangre de cordón umbilical, empleándose un panel con 13 protocolos o tubos (*Tabla 4.2*). Los dos primeros tubos se utilizaron para realizar el “TBNK” y los otros 11 tubos para caracterizar las distintas subpoblaciones linfocitarias objetivo del estudio.

El método empleado para la obtención del número absoluto de linfocitos T, T CD4+, T CD8+, B y NK (TBNK) fue la técnica de FLOW-COUNT™ (Beckman-Coulter), que se realizó en sangre total. Esta técnica utiliza un número conocido de bolas fluorescentes que se añaden a la sangre del cordón umbilical del neonato objeto de estudio y que se unen a todas las células, siendo detectadas por el citómetro de flujo, lo que permite multiplicar la ratio o razón “número de células adquiridas/número de bolas adquiridas” por la concentración de bolas por μl de sangre de cordón umbilical. Se obtuvo así el número absoluto de cada población celular por mm^3 de sangre total de cordón umbilical.

Las subpoblaciones celulares se analizaron usando la técnica de marcaje en cuatro colores en sangre total, con lisado y lavado celular. A 50 μl de sangre de cordón umbilical, se añadieron 15 μl de la mezcla de anticuerpos específica de cada protocolo o tubo (*Tabla 2*). La incubación y lisado de hematíes se realizó a temperatura ambiente y en oscuridad, durante 10 min., utilizando el ensayo “ImmunoPrep™ Reagent System” (Beckman-Coulter) y el aparato de lisis “Coulter TQ prep” (Beckman-Coulter). Inmediatamente después, se realizó la lectura de emisión de fluorescencia en un

citómetro de flujo EPICS® XL (Beckman-Coulter) usando el programa de adquisición Expo32 (Beckman-Coulter). Se adquirieron 10000 eventos viables dentro de la puerta de adquisición específica para cada tipo de células. También se midieron las intensidades relativas de fluorescencia (IRF), como la media de IRF (MIF), usando histogramas simples sin cursor. El análisis de los datos se realizó con el programa de análisis Expo32 (Beckman-Coulter).

Tabla 4.2. Anticuerpos monoclonales utilizados para la caracterización fenotípica de las subpoblaciones linfocitarias en sangre de cordón umbilical.

Nº.	FITC	PE o RD	ECD	PC-5
Células T, B, NK (FLOW-COUNT)				
1.	anti-CD45	anti-CD4	anti-CD8	anti-CD3
2.	anti-CD45	anti-CD56+CD16	anti-CD19	anti-CD3
Subpoblaciones linfocitarias T				
3.	anti-CD2	anti-CD11a	anti-CD3	anti-CD62L
4.	anti-CD71	anti-CD1a	anti-CD3	anti-CD25
Subpoblaciones T CD4+				
5.	anti-CD38	Anti-HLA-DR	anti-CD45RO	anti-CD4
6.	anti-CD45RA	anti-CD27	anti-CD45RO	anti-CD4
Subpoblaciones T CD8+				
7.	anti-CD38	Anti-HLA-DR	anti-CD45RO	anti-CD8
8.	anti-CD45RA	anti-CD27	anti-CD45RO	anti-CD8
Subpoblaciones linfocitarias NK				
9.	anti-Kir-NKAT2	anti-Kir-p70	anti-CD3	anti-CD56+CD16
Subpoblaciones linfocitarias B				
10.	anti-CD38	anti-CD40	anti-CD19	anti-CD62L
11.	anti-HLA-DR	anti-CD11a	anti-CD19	anti-CD5
Mieloides-Plasmacitoides (puerta SSC vs FSC)				
12.	BDCA-2	BDCA-1	anti-CD4	anti-CD19
Precursores hematopoyéticos				
13.	anti-CD45	anti-CD133	anti-CD34	anti-CD24

Los parámetros óptimos para la adquisición (sensibilidad del detector, amplificación del detector, compensación de las distintas fluorescencias) se determinaron usando los reactivos Cyto-Comp™ Cell Kit, Cyto-Stat™, e Immuno-Troll™ Cells (Beckman-Coulter) y el programa System II V 3.0 (Beckman-Coulter) de forma periódica.

4.2.2. SEPARACIÓN INMUNOMAGNÉTICA DE SUBPOBLACIONES CELULARES.

La separación de las poblaciones leucocitarias en fracciones de monocitos CD14+, células T CD4+, células T CD8+ y la fracción negativa que incluye células B y granulocitos (neutrófilos y eosinófilos) (ver *Figura 2*) se realizó utilizando el separador magnético de células *autoMACS* (Miltenyi Biotec, GmbH), en columnas de selección positiva, sobre células previamente marcadas con anticuerpos específicos, que llevan incorporadas bolitas magnéticas (*MACS Microbeads*).

4.2.2.1. Separación de monocitos CD14+.

Tras el aislamiento de células mononucleares de sangre de cordón umbilical (CMSCUs) por gradiente de Ficoll, se centrifugaron durante 10 min. a 1500 rpm. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado o *pellet* celular, tras lo que se añadieron 20 µL de α CD14 *Microbeads* + 80 µL de *Running Buffer* (PBS 0,067M + 2mM EDTA + 0,5% BSA) por cada 10^7 CMSCUs. La mezcla se incubó durante 15-20 min. a 4°C, en oscuridad, tras lo cual se lavó con 3 mL de *Running Buffer* a 1700 rpm durante 10 min. para eliminar los restos de anticuerpo no unido. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 0,5 mL de *Running Buffer*.

Los monocitos CD14+ se separaron mediante el programa de separación POSSELD (doble separación positiva), para asegurar la máxima pureza de la fracción.

4.2.2.2. Separación de linfocitos T CD4+.

La fracción negativa obtenida de la separación de CD14+ se centrifugó durante 10 min., 1500 rpm, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* celular, tras lo que se añadieron 20 μ L de anticuerpo monoclonal anti-CD4 *Microbeads* + 80 μ L de *Running Buffer* (PBS 0,067M + 2mM EDTA + 0,5% BSA) por cada 10^7 células CD14-. La mezcla se incubó durante 15-20 min. a 4°C, en oscuridad, tras lo cual se lavó con 3 mL de *Running Buffer* a 1700 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 0,5 mL de *Running Buffer*. Los linfocitos T CD4+ se separaron mediante el programa de separación POSSEL (separación positiva) y se dividieron en alícuotas de 1×10^6 y de 2×10^6 CD4+, en forma de precipitado o *pellet* seco, que se almacenaron a -70°C hasta su utilización para técnicas de biología molecular.

4.2.2.3. Separación de linfocitos T CD8+.

La fracción negativa obtenida de la separación de CD4+ se trató exactamente igual que en el apartado anterior, añadiendo 20 μ L de anticuerpo monoclonal anti-CD8 *Microbeads* + 80 μ L de *Running Buffer* por cada 10^7 células CD4-, seleccionándose también el programa de separación POSSEL (separación positiva). Se hicieron alícuotas de 1×10^6 y de 2×10^6 CD8+, en forma de precipitado o *pellet* seco, que se almacenaron a -70°C hasta su utilización para técnicas de biología molecular.

4.2.2.4. Linfocitos B.

La fracción de linfocitos B fue la fracción CD8 negativa que se obtuvo de la separación anterior. Se hicieron alícuotas de 2×10^6 linfocitos B, en forma de precipitado o *pellet* seco, que se almacenaron a -70°C hasta su utilización para técnicas de biología molecular.

4.2.3. CUANTIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS.

Se cuantificaron las inmunoglobulinas (Igs) de los subtipos G (IgG), A (IgA) y M (IgM) en el plasma procedente de la sangre de cordón umbilical, obtenido tras la separación celular por gradiente de Ficoll, en colaboración con el Hospital Universitario “Virgen del Rocío” de Sevilla. La cuantificación de las Igs se realizó por *nefelometría*, que se basa en la medida de la dispersión de la luz que provoca el inmunocomplejo formado entre un antisuero monoespecífico y el analito de la muestra (Ig).

4.2.4. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA CADENA H DEL RECEPTOR DE CÉLULAS B (BCR-V_H).

Las células B se aislaron por separación inmunomagnética (punto 4.2.2.4.), se extrajo el ARNt (*SV Total RNA Isolation System*; Promega) y se cuantificó la cantidad del mismo (NanoDrop® ND-1000), con el fin de poner la misma cantidad de molde en todas las muestras en la posterior PCR. La reacción de retrotranscripción se realizó utilizando el kit “Im-Prom IITM Reverse-Transcription System; Promega), en un volumen final de 60 µL y con oligo dT como *primer*, durante 1 h. a 42°C. Para la amplificación y marcaje, los *primers* utilizados fueron: los específicos de las 6 subfamilias de genes del BCR-V_H (V_H1-6) (Eurogentec, S.A.), y para la región J del BCR-V_H, una mezcla consenso de *primers* (J_H mix=J_H1-5 + J_H6, en proporción 5:1), marcado en 5' con el fluoróforo 6-FAM (Applied Biosystems UK), todos ellos descritos previamente [39].

Para evaluar la expresión de cada subfamilia V_H, se diseñó una PCR “cualitativa”, con el fluoróforo *SYBR® Green* como sonda de detección, usando el sistema Mx3005P QPCR Systems (Stratagene®, La Jolla, CA, USA). El *primer* que anillaba en la dirección 3'-5' fue el mismo J_H mix descrito anteriormente, pero sin el

fluoróforo en el extremo 5'. La mezcla de reacción fue la proporcionada por el kit "Brilliant® SYBR® Green QPCR Master Mix" (Stratagene®, La Jolla, CA, USA) y el programa utilizado: desnaturalización a 95°C, 10 min.; 44 ciclos de amplificación (95°C, 1 min.; 69°C, 1 min.; 72°C, 1,5 min.); un ciclo de *melting*, para la obtención de las curvas de disociación (95°C, 1 min; 55°C, 30 seg., con una rampa de subida de temperatura a 95°C de 0,01°C/seg.); y una elongación final de 10 min. a 72°C. La expresión del ARNm mensajero (ARNm) de las subfamilias V_H se normalizó con el gen de la β -actina.

Con las subfamilias que mostraron expresión, se procedió a obtener un producto de PCR marcado en 5' con el fluoróforo 6-FAM, usando el kit "PCR Master Mix" (Promega) en un volumen final de 50 μ l. El programa de PCR fue el siguiente: un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 10 min.; 44 ciclos de amplificación y marcaje (95°C, 1 min.; 69°C, 1 min.; 72°C, 1,5 min.); una elongación final de 10 min. a 72°C. Los productos de PCR marcados, se analizaron por electroforesis capilar en un secuenciador Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems) y usando el software Gene Scan 3.7 (Applied Biosystems).

4.2.5. CUANTIFICACIÓN DEL RATIO Δ TREC/BTREC.

Esta técnica se realizó en colaboración con el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Universitario "Virgen del Rocío" de Sevilla.

De CMSCUs totales o de células T CD4+, aisladas previamente por separación inmunomagnética (punto 4.2.2.2.), se extrajo el ADN y se cuantificó su concentración. La determinación de la cantidad de β - y δ -TRECs se llevó a cabo según el siguiente protocolo: 1) amplificación de los 6 fragmentos de β -TRECs y amplificación de los δ -TRECs, ambas rondas de amplificación hechas en paralelo, con una desnaturalización

inicial a 95°C durante 10 min, seguida de 20 ciclos de 20 s. a 95° C, 45 s. a 57°C y 30 s. a 72°C, y una elongación final a 72°C durante 5 min. 2) amplificación de β - y δ -TRECs a la vez, por PCR cuantitativa a tiempo real usando el kit LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS (Roche Molecular Biochemicals) y en el propio sistema LightCycler®, a 95°C durante 10 min, seguidos por 45 ciclos de 95°C durante 10 s, 57°C durante 20 s, y 72°C durante 15 s. La fluorescencia se adquirió al final de la fase de anillamiento, usando sondas de hibridación acopladas a los fluoróforos aceptores LC640 o Red705.

Todas las muestras se determinaron por triplicado, tanto para los β - como para los δ -TRECs.

La secuencia y cantidad de los *primers*, así como de las sondas utilizadas, se detallan en la *Tabla 4.3*.

Para la curva estándar, los productos de β - y δ -TRECs de la primera amplificación se clonaron en el plásmido pGEM-EASY (Promega, Madison, WI), según las instrucciones del fabricante. La concentración de los diferentes plásmidos se determinó realizando PCR cuantitativa a tiempo real, utilizando los oligonucleótidos o *primers* SP6/T7 y el sistema LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Las condiciones de la PCR fueron: 10 s. a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 95°C durante 10 s., 50°C durante 15 s. y 72°C durante 20s. La curva estándar para la determinación del ratio se hizo mezclando el plásmido δ -TREC con una mezcla equimolecular de los 4 fragmentos de β -TREC clonados (25:1). Para determinar la concentración de β - y δ -TREC, se hicieron diluciones seriadas de la curva estándar, mezcla de plásmidos.

Tabla 4.3. Secuencias de los primers y sondas utilizados en la determinación de los β - y δ -TRECs. Se especifica la ronda de amplificación en la que se utiliza cada uno y la concentración de los mismo.

Ronda Amplif.	Nombre	Conc (nM)	Secuencia
<i>PRIMERS</i>			
1ª ronda β -TRECs	T3A	80	CGGCCGTAGCGACGTACCCTTTTCGATGGACCCTCACAG
	T3B	80	CGGCCGTAGCGACGTACCGACAAGGCACCAGACTCACAG
	T3C	80	CGGCCGTAGCGACGTACCAAGCTCTGGAAGGGAACACAG
	T3D	80	CGGCCGTAGCGACGTACCCCGTTTCTCTCCCTCACACAG
	T3E	80	CGGCCGTAGCGACGTACCGGGCAGAACTGAGAACACAG
	T3F	80	CGGCCGTAGCGACGTACCCTTGCGCCTTATGCTGCACAG
	AS	280	TGAACCAAATTGCATTAAGACC
1ª ronda δ -TRECs	DTR61	100	TCTGACATTTGCTCCGTG
	DTF6	100	AGAAGGCTCTGTCTAGTGTG
2ª ronda $\beta + \delta$ TRECs	DTF7	200	AGGCTCTGTCTAGTGTGATAAC
	T2	200	CCCAGGAGGAAAGAAGAGGAC
	T3R	200	CGGCCGTAGCGACGTACC
	DTR66	200	TGACATGGAGGGCTGAAC
<i>SONDAS</i>			
2ª ronda $\beta + \delta$ TRECs	P1	200	CTGGGAGTTGGGACCGCCAGAGAGGT-FL
	P2	200	Red705-TTTGTAAAGGTTTCCCGTAGAGTTGAATCATTGTG-PH
	TCRFL	200	AGGGATGTGGCATCACCTTTGTTGACA-FL
	TCRLC	200	LC640-GGCACCCCTCTGTTCCCCACAGGA-PH

El ratio δ/β TREC por 10^6 CMSCUs o 10^6 T CD4+ se calculó a partir de las cantidades conocidas de los fragmentos clonados, el *crossing point* de las moléculas de β - y δ -TREC obtenido en la PCR cuantitativa y las concentraciones de ADN conocidas de cada muestra.

4.2.6. CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS.

La cuantificación de las citocinas IL-7 y TSLP se realizó en el plasma obtenido tras aislar las CMSCUs por gradiente de Ficoll, que fue almacenado a -70°C hasta dichas determinaciones. La cuantificación se llevó a cabo mediante ensayos de ELISA, con los kit “Quantikine HS[®] Human IL-7” y “Quantikine Human TSLP” (R&D Systems, Abingdon, UK), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para analizar las respuestas inmunológicas Th1 y Th2, se cuantificaron un total de 11 citocinas en el plasma procedente de las CMSCUs,. Se utilizó el kit “FlowCytomix Human Th1/Th2 11plex kit” (Bender MedSystems GmbH, Viena, Austria), según las instrucciones del fabricante. Este sistema se basa en la detección cuantitativa de nivel de citocinas mediante un sistema de bolitas magnéticas o *beads* que se unen al analito que se quiere cuantificar. Las citocinas que se cuantificadas fueron: IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF α y TNF β . El experimento se llevó a cabo en un citómetro Cytomics FC 500 (Beckman Culter).

4.2.7. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA CADENA B DEL RECEPTOR DE CÉLULAS T (TCR-VB).

De las alícuotas de 2×10^6 CD4⁺ o de CD8⁺, aisladas por separación inmunomagnética (puntos 4.2.2.2. y 4.2.2.3.), se extrajo el ARNt (*SV Total RNA Isolation System*; Promega) y se cuantificó la cantidad del mismo modo que en el apartado 4.2.4. El paso de ARNt a ADNc, o reacción de retrotranscripción, se realizó en un volumen final de 50 μl (Access Quick[™] RT-PCR System; Promega), en un termociclador Biometra[®] T-Gradient, añadiendo a la mezcla de reacción un volumen correspondiente a 100 ng de ARNt de cada muestra, según el siguiente programa: 45 min. a 48°C , seguido de un mantenimiento a 4°C . La obtención de ADN de doble

cadena y el marcaje de los productos de amplificación con un fluoróforo adecuado para el posterior análisis en un secuenciador, se realizó en el mismo paso y a partir de un volumen de 2 μ l de ADNc, usando el kit “PCR Master Mix” (Promega) en un volumen final de 50 μ l, de nuevo en un termociclador Biometra[®] T-Gradient. Los *primers* utilizados para la amplificación y marcaje fueron: los específicos de las 24 subfamilias de genes del TCR-V β (Eurogentec, S.A.), descritos previamente [40] y que en esta Memoria se han denominado: V β ₁- V β ₂₄, y un *primer* que anilla en la región constante del TCR-V β (C β mar) [41], marcado en 5' con el fluoróforo 6-FAM (Applied Biosystems UK, Warrington, Cheshire). El programa de PCR fue: un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 3 min.; 35 ciclos de amplificación y marcaje (94°C, 1 min.; 60°C, 1 min.; 72°C, 2 min.); una elongación final de 7 min. a 72°C. Los productos de PCR marcados se sometieron a un análisis de fragmentos, por electroforesis capilar, en un secuenciador Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems) y usando el software Gene Scan 3.7 (Applied Biosystems).

4.2.8. CULTIVOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR.

De las CMSCUs aisladas de cada muestra de cordón umbilical, se apartó un mínimo de 10×10^6 células, que se congelaron a viabilidad en 1 mL de medio de congelación (suero de ternera fetal –FCS-, 5% DMSO). Para el ensayo de proliferación, por cada muestra se descongeló el vial de células añadiendo lentamente RPMI-1640 con un 20% de FCS, previamente atemperado a 37°C. Se cultivaron las células en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37°C, 5% CO₂, durante 24 h. Al día siguiente, se lavaron las células a 1500 rpm durante 10 min., se contaron en cámara de Neubauer, se añadió medio de cultivo hasta conseguir una concentración de 2×10^6 células/mL y se plaquearon 2×10^5 células (100 μ L) por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo en U,

que fueron previamente preparadas con los siguientes estímulos mitogénicos: 1 µg/mL de fitohemaglutinina (PHA; Murex Biotech Limited, Dartford, England), ó 1 µg/mL de anti-CD3 (clon: UCHT1, *mouse anti-human*; BD Biosciences Pharmingen) + 1 µg/mL de anti-CD28 (clon: L293, *mouse anti-human*; BD Biosciences, San Jose, CA), ó 4 µg/mL de *pokeweed mitogen* (PWM; Sigma Chemical co, St Louis, Missouri, USA). Todos los estímulos fueron analizados por duplicado. Los cultivos se mantuvieron durante 72 h. a 37°C y 5% de CO₂. En cada muestra, se utilizaron como control negativo las células sin estimular.

La respuesta linfoproliferativa se determinó mediante el kit “BrdU Cell Proliferation Assay” (Chemicon[®] International, Temecula, CA), que se basa en la medida de la incorporación de Bromo-deoxi-Uridina (BrdU) en ADN de nueva síntesis de las células que están proliferando activamente. Así, 18 h. antes de la medida, se añadieron 20 µL de BrdU/pocillo y se incubaron las células a 37°C, 5% CO₂. Tras la incubación O/N, se procedió a desarrollar el inmunoensayo, según las instrucciones del fabricante.

Las medidas de proliferación se dieron como “Índice de Estimulación”, valor que se obtuvo de corregir la medida de la proliferación con cada estímulo dividiéndola por la medida de la proliferación basal (es decir, de las células sin estimular).

4.2.9. CULTIVO DE MONOCITOS CD14+.

Los monocitos CD14+ procedentes de CMSCUs se cultivaron a una concentración de 10⁶/mL en placas de 24 pocillos de fondo plano, en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con un 10% de suero de ternera fetal, L-glutamina (10 mM) y una mezcla de antibióticos (ampicilina, cloxaciclina y gentamicina). Las células se estimularon con 500 ng/mL de lipopolisacárido (LPS) (Sigma), ó 500 ng/mL de LPS

más 500 UI/mL de interferón- γ (IFN- γ) (Sigma). En cada experimento, se incluyó como control el mismo número de monocitos CD14⁺ sin estimular. Los cultivos se incubaron a 37°C, en atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ durante 40-42 horas. Tras ese tiempo, se retiraron 300 μ L de sobrenadante, que se congeló a -70°C hasta la posterior cuantificación de citocinas. Se recogieron 50000 células por punto y el número restante se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min. y se almacenó el precipitado o *pellet* seco a -70°C para posteriores ensayos de biología molecular.

4.2.10. ANÁLISIS DE MARCADORES DE SUPERFICIE DE ACTIVACIÓN Y ADHESIÓN EN MONOCITOS.

Los monocitos estimulados se incubaron primero con suero AB durante 10 min. a 4°C y en oscuridad, para evitar interacciones inespecíficas de los anticuerpos. Posteriormente, se marcaron con 15 μ L de una mezcla de anticuerpos monoclonales (Cyto-Stat® Tetra-Chrome™) según se muestra en la *Tabla 4.4*.

Tabla 4.4. Anticuerpos monoclonales utilizados en el marcaje de los monocitos estimulados.

nº.tubo	<i>FITC</i>	<i>PE</i>	<i>ECD</i>
1	anti-HLADR	anti-CD40	anti-CD69
2	anti-CD80	anti-CD86	anti-CD25
3	anti-CD54	anti-CD11c	anti-CD16

La proporción de cada subpoblación de monocitos se cuantificó por citometría de flujo en un citómetro de flujo EPICS® XL (Beckman-Coulter) de 3 colores, utilizando el programa de adquisición Expo32 (Beckman-Coulter). Se adquirieron 5000 eventos viables dentro de la puerta de adquisición específica para cada subpoblación de monocitos. También se analizaron las intensidades relativas de fluorescencia (IRF)

como la media de IRF (MIF), utilizando histogramas simples sin cursor. El análisis de los datos se realizó con el programa de análisis Expo32 (Beckman-Coulter).

4.2.11. CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS EN EL SOBRENADANTE DE LOS CULTIVOS DE MONOCITOS ACTIVADOS.

La cuantificación de citocinas en el sobrenadante de los cultivos de monocitos se realizó por un inmunoensayo MULTIPLEX de suspensión de bolitas (*beads*), usando el analizador Luminex 100 (Luminex Corp., Austin, TX). Con el kit “Human Cytokine Lincoplex Kit” (LINCO Research, Missouri, USA) se cuantificó específicamente la producción de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL 12(p-40), IL-8 y TGF- α . Los estándares se prepararon a partir de liofilizados, haciendo diluciones seriadas. Se transfirieron 50 μ L de cada muestra a una placa de 96 pocillos (MultiScreen 96-well filter plate, Millipore, Bedford, MA, # MABVN1210) en los que se encontraba pegado una cantidad diluida de un complejo compuesto por la mezcla de los anticuerpos contra cada una de las citocinas a medir. Tras una incubación de 2 h. a temperatura ambiente y en oscuridad, se lavó la placa con el diluyente adecuado (100 μ L/pocillo) y se añadieron 100 μ L de anticuerpo secundario biotinilado a todos los pocillos. Se incubó la placa durante 1 h. a temperatura ambiente y en oscuridad, tras lo cual se lavó como anteriormente y se añadieron 100 μ L de estreptavidina a todos los pocillos. Se incubó durante 30 min. Se hizo un lavado final de toda la placa y se procedió a la lectura de la misma.

El límite inferior de detección de la técnica es de 3,2 pg/mL y el límite superior es de 10000 pg/mL. Se recogieron un mínimo de 100 eventos (*beads*) para cada una de las seis citocinas, obteniéndose valores de intensidad media de fluorescencia (IMF).

4.2.12. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CD14 Y TLR4 EN MONOCITOS ACTIVADOS.

Del precipitado o *pellet* seco obtenido de los experimentos realizados con distintos estímulos, se aisló el ARN total (ARNt), con el kit “SV Total RNA Isolation System” (Promega Corporation, Madison WI, USA), usando oligo dT como *primer* de un total de 9 neonatos (5 neonatos de < 30 semanas de gestación y 4 de > 37 semanas de gestación al nacimiento). Se cuantificó el ARNt, utilizando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. Se obtuvieron entre 100-200 ng de de ARNt que se retrotranscribió a ADN complementario (ADNc) con el kit “ImProm-II TM Reverse-Transcription System” kit (Promega Corporation, Madison WI, USA), según las instrucciones del fabricante. Se usaron 2 µL del ADNc para la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real del ARN mensajero (ARNm) de los receptores CD14 y TLR4. La expresión de ARNm de CD14 y de TLR4 se normalizó con la expresión del ARNm del gen 18s. La mezcla de reacción fue la proporcionada por el sistema “Brilliant® SYBR® QPCR Master Mix” (Stratagene®, La Jolla, CA, USA). Las secuencias de los *primers* utilizados fueron:

- TLR4 humano (producto de 270 pb): 5'-GGAGCCCTGCGTGGAGGTG (*forward*) y 5'-CTCTGGATGGGGTTTCCTGTCAAT (*reverse*).
- CD14 (producto de 454 pb): 5'-GGTGCCGCTGTGTAGGAAAGA (*forward*) y 5'-GGTCCTCGAGCGTCAGTTCCT (*reverse*).
- 18s (producto de 110 pb): 5'-GCAATTATTCCCCATGAACG (*forward*) y 5'-GGGACTTAATCAACGCAAGC (*reverse*).

La amplificación se hizo en un termociclador MX3005P (Stratagene®, La Jolla, CA, USA), durante 40 ciclos a: 95°C durante 45 seg, seguido de otros 45 seg a 56°C para el

anillamiento, y 1 min a 72°C para la fase de elongación. Mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, se comprobó que los productos de amplificación tenían el tamaño deseado. Se elaboraron “curvas de disociación” o *Melting* para asegurar la especificidad del ensayo.

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

4.3.1. Análisis descriptivo de la población.

Los resultados de las variables cuantitativas se han presentado por su media y desviación típica, o bien por su mediana y rango intercuartílico (percentiles 25 y 75) para cada edad gestacional. Las variables cualitativas se expresaron mediante sus frecuencias y porcentajes, también por edad gestacional.

4.3.2. Análisis estadístico de resultados.

Se estudiaron las diferencias entre los marcadores en los distintos grupos de niños, aplicándose en cada caso las pruebas estadísticas más convenientes. Se utilizó el test no paramétrico de rangos de la U de Mann-Whitney, cuando el análisis se hizo por semanas gestacionales, debido al tamaño y distribución de los grupos. Cuando se compararon los 3 grupos gestacionales, se utilizó el test paramétrico ANOVA, con la prueba Levene para evaluar la homogeneidad de varianzas. Posteriormente, se utilizó la corrección de Bonferroni o la de Tamhane. La normalidad de las variables numéricas se estudió con la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

También se realizaron análisis multivariantes de regresión logística para controlar los diferentes factores de confusión e interacción, relativos a los antecedentes maternos. Se evaluó la influencia de la *edad materna*, la *paridad*, el *tiempo de rpm* (*rotura prematura de membrana*), si hubo o no un *control adecuado de la gestación* y

haber tomado *fármacos ajenos al parto* en la edad gestacional; es decir, se evaluó si influyeron en la prematuridad o no del parto.

Se analizaron la relación y la asociación estadística entre las diferentes variables inmunológicas y clínicas estudiadas. En el caso de variables cuantitativas, se utilizó el test de correlación no paramétrica Rho de Spearman. La asociación entre las variables cualitativas se midió con la prueba χ^2 (chi-cuadrado) o prueba exacta de Fisher en función del tamaño muestral.

Todos los análisis estadísticos estuvieron sujetos a la calidad y naturaleza de los datos, y a las limitaciones propias del estudio: tamaño de los grupos, pérdida o desconocimiento de los datos, características de las variables (condiciones de normalidad, homocedasticidad, etc.).

Para el análisis estadístico se utilizó el programa *SPSS 15*. En todos los casos, se consideraron las diferencias como estadísticamente significativas únicamente cuando $p \leq 0,05$ y sólo se tuvieron en cuenta dichas diferencias cuando el tamaño muestral de los grupos que se comparaban era $n > 5$.

En el análisis de la expresión de las subfamilias del BCR, se calculó la media del C_t o *cycle of threshold* (ciclo de amplificación al cual se sobrepasa el nivel al que se comienza a detectar el producto de la PCR) de los neonatos nacidos en la misma semana de gestación. Los valores de expresión de cada subfamilia se obtuvieron con respecto al valor de C_t más bajo y al que se dio el valor 1, aplicando la fórmula:

$$\text{Cantidad} = 2^{C_t(+ \text{ bajo}) - C_t(X)}.$$

El valor de expresión final se obtuvo después de normalizar con el valor de expresión del gen de la β -actina.

El análisis de la expresión de los receptores CD14 y TLR4 se realizó de forma similar al del BCR, pero se normalizó con la expresión del gen 18s.

Además, se calcularon las Medias \pm Error Estándar de la Media (EEM) de los valores de expresión de cada subfamilia por cada grupo gestacional.

En el estudio de activación de monocitos, la concentración de cada citocina se calculó automáticamente, con la curva estándar generada, usando el programa *MasterPlex_QT Analysis version 2* (MiraiBio, Inc., Alameda, CA). Las concentraciones así calculadas se exportaron a un formato compatible donde se generaron las correspondientes gráficas y se analizaron. Se aplicó el test de la *t de Student* con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$) para cada comparación, usando el programa *Graphpad Prism version 4* (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA).

5.RESULTADOS

5.1. SUJETOS Y TIPO DE ESTUDIO.

Se realizó un estudio transversal descriptivo, en un total de **183** neonatos, distribuidos por semanas de gestación (*semana a semana*) y por grupos gestacionales (*muy pretérmino*, *pretérmino* y *a término*), como se muestra en la *Tabla 5.1*:

Tabla 5.1. Número de neonatos incluidos en el estudio, divididas por grupos según semanas de gestación (*semana a semana*, de la semana 25 a la 42) y grupos de edad gestacional (*muy pretérmino*: ≤ 30 semanas de gestación; *pretérmino*: semanas 31 a 36; *a término*: ≥ 37 semanas de gestación).

	Edad gestacional (semanas)	Nº.	Grupo gestacional	Nº.	
<i>Semana a Semana</i>	25	2	≤ 30	23	<i>Muy pretérmino</i>
	27	3			
	28	3			
	29	11			
	30	4			
	31	6	31-36	74	<i>Pretérmino</i>
	32	15			
	33	13			
	34	11			
	35	17			
	36	12			
	37	13	≥ 37	86	<i>A término</i>
	38	14			
	39	21			
	40	18			
	41	18			
	42	2			
TOTAL:		183			

5.1.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS MADRES.

En la *Tabla 5.2* se describen las características más relevantes relativas a las madres y al tipo de parto de los 183 neonatos incluidos en el estudio.

Tabla 5.2. Características más importantes de las madres de los 183 neonatos incluidos en el estudio, relativas a la gestación y al momento del parto.

Características	N (%)
<i>Edad Madre</i>	
< 35 años	120 (65,6)
≥ 35 años	41 (22,4)
No dato disponible	22 (12,0)
<i>Nº gestaciones anteriores</i>	
Ninguna	31 (16,9)
1	71 (38,8)
Más de 1	54 (29,5)
No dato disponible	27 (14,8)
<i>Tiempo de RPM</i>	
≤24 h	129 (70,5)
>24 h	16 (8,7)
No dato disponible	38 (20,8)
<i>Control gestación</i>	
Sí	138 (75,4)
No	11 (6,0)
No dato disponible	34 (18,6)
<i>Fármacos ajenos</i>	
Sí	40 (21,9)
No	110 (60,1)
No dato disponible	33 (18,0)

RPM: Rotura Prematura de Membranas. *Control gestación*: control médico/obstétrico adecuado durante toda la gestación, para evitar factores de riesgo, como posibles infecciones no controladas. *Fármacos ajenos*: toma de medicamentos ajenos a la historia natural del parto, por alguna patología causada o no por la gestación.

Se analizó la influencia de la *edad materna*, la *paridad*, el *tiempo de rpm* (*rotura prematura de membranas*), si hubo o no *control adecuado de la gestación* y haber tomado *fármacos ajenos al parto* (aquella medicación no relacionada con la historia natural del parto) en la edad gestacional. Se realizaron dos análisis multivariantes de

regresión logística. En el primer análisis, se dividió a los neonatos en < 37 semanas y ≥ 37 semanas. Cuando se introdujeron las variables mencionadas (*edad materna, paridad, tiempo de rpm, control adecuado de la gestación, fármacos ajenos al parto* y *edad gestacional*) en el análisis multivariante, sólo el *control adecuado* y tomar *fármacos ajenos al parto* influyeron en la edad gestacional, siendo independientes entre sí. Al calcular el *Odds ratio* para cada variable, se observó que el haber tenido un *control adecuado de la gestación* disminuyó en 10,9 veces el riesgo de tener un parto prematuro, mientras que el haber tomado *fármacos ajenos al parto* aumentó en 10,4 veces el riesgo de parto prematuro. En el segundo análisis, se dividió a los neonatos en ≤ 30 semanas y >30 semanas, y sólo el no haber tenido un *control adecuado de la gestación* aumentó el riesgo de tener un parto muy prematuro en 26,3 veces.

5.1.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS NEONATOS.

Los neonatos incluidos en esta Memoria nacieron bajo condiciones de “no estrés”, como se observó al analizar algunas de las características más importantes en el momento del parto: mediana del pH arterial umbilical= 7,30 (p25=7,25; p75=7,35); mediana del Ápgar en el 1^{er} minuto= 9 (p25=8; p75=9) y mediana del Ápgar en el 5^o minuto= 9 (p25=9; p75=9).

En la *Tabla 5.3.* se muestran las características más importantes relativas al momento del parto de 159 de los 183 neonatos incluidos en el estudio, *semana a semana* de gestación.

Tabla 5.3. Características más relevantes de 159 de los 183 neonatos incluidos en el estudio, divididos por edad gestacional en semanas, en el momento del parto.

Edad gestacional	N	PH		Apgar 1º		Apgar 5º	
		Mediana	(mín.;máx.)	Mediana	(mín.;máx.)	Mediana	(mín.;máx.)
25	2	7,38	(7,38 ; 7,38)	7	(7 ; 7)	8	(8 ; 8)
27	3	7,44	(7,38 ; 7,48)	7	(5 ; 7)	8	(7 ; 9)
28	3	7,39	(7,32 ; 7,41)	7,5	(6 ; 9)	8,5	(8 ; 9)
29	11	7,34	(7,22 ; 7,43)	8	(4 ; 9)	9	(8 ; 10)
30	4	7,39	(7,21 ; 7,45)	7	(5 ; 9)	8,5	(7 ; 9)
31	6	7,3	(7,27 ; 7,35)	8	(5 ; 9)	9	(8 ; 9)
32	14	7,31	(7,20 ; 7,41)	8	(1 ; 9)	9	(5 ; 9)
33	9	7,31	(7,23 ; 7,40)	9	(8 ; 10)	9	(9 ; 10)
34	9	7,27	(7,10 ; 7,36)	8	(7 ; 9)	9	(9 ; 9)
35	13	7,34	(7,17 ; 7,40)	9	(7 ; 9)	9	(9 ; 10)
36	12	7,34	(7,28 ; 7,39)	9	(8 ; 10)	9	(8 ; 10)
37	12	7,27	(7,16 ; 7,41)	8	(7 ; 9)	9	(8 ; 10)
38	13	7,3	(7,10 ; 7,36)	9	(7 ; 9)	9	(8 ; 10)
39	15	7,31	(7,19 ; 7,41)	9	(7 ; 9)	9	(9 ; 10)
40	14	7,27	(7,09 ; 7,37)	9	(6 ; 9)	9	(9 ; 10)
41	18	7,27	(7,03 ; 7,39)	9	(6 ; 9)	9	(8 ; 10)
42	1	7,24		9		9	
Total	159						

Los valores de cada variable se describen como Mediana (Mínimo ; Máximo) para cada semana de gestación.

Se analizó la mediana del peso al nacer= 2815 g (p25=1920 g; p75= 3310 g) de 159 de los 183 neonatos incluidos en el estudio. También se calcularon los valores del peso al nacer *semana a semana* (Tabla 5.4).

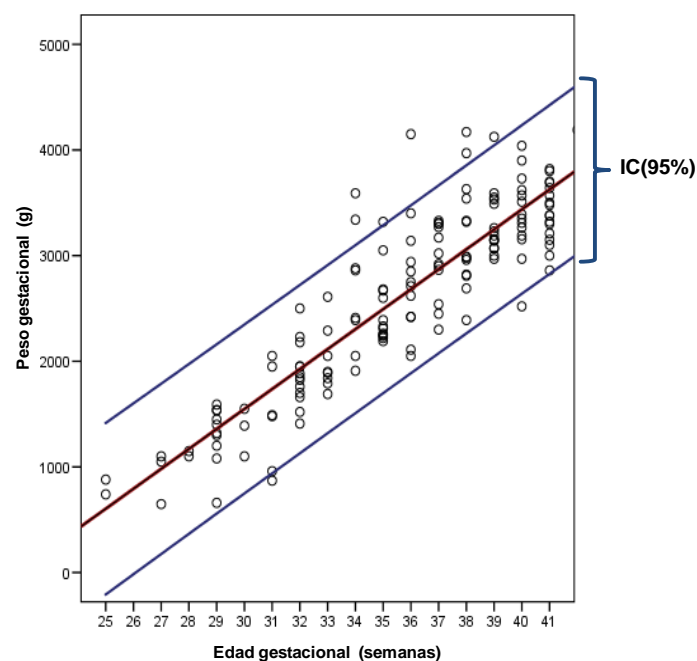
Tabla 5.4. Valores del peso al nacimiento de 159 de los 183 neonatos incluidos en el estudio, por semanas de gestación.

Edad gestacional	N	Peso	
		Mediana	(mín.;máx.)
25	2	810	(740 ; 880)
27	3	1050	(648 ; 1100)
28	3	1125	(1100 ; 1150)
29	11	1360	(660 ; 1590)
30	4	1390	(1100 ; 1550)
31	6	1485	(870 ; 2050)
32	14	1850	(1410 ; 2500)
33	9	1895	(1690 ; 2610)
34	9	2635	(1910 ; 3590)
35	13	2330	(2190 ; 3320)
36	12	2730	(2050 ; 4150)
37	12	2970	(2300 ; 3330)
38	13	2990	(2390 ; 4170)
39	15	3190	(2970 ; 4125)
40	14	3370	(2520 ; 4040)
41	18	3380	(2860 ; 3820)
42	1	4190	
Total	159		

Se describen los valores como Mediana (Mínimo;Máximo) para cada semana de gestación.

Debido a la importancia del peso del neonato en el momento del nacimiento y su posible relación con la prematuridad, se analizó la correlación entre la edad gestacional y el peso al nacimiento de los neonatos incluidos en el estudio y se observó una asociación lineal positiva ($R=0,889$; $p<0,001$) (*Figura 5.1*). Además, 150 de los 159 neonatos incluidos en esta parte del estudio tuvieron un peso al nacimiento que se encontraba dentro del intervalo de confianza del 95%, es decir, el peso al nacer fue el correspondiente a su edad gestacional.

Figura 5.1. Asociación lineal positiva entre edad gestacional y peso al nacimiento de 159 de los 183 neonatos incluidos en el estudio, por semanas de gestación. El test aplicado fue el de correlación de Pearson ($R=0,889$; $p<0,001$). *IC(95%)*: Intervalo de Confianza del 95%.



5.2. POBLACIONES CELULARES T, B Y NK.

Las respuestas inmunitarias están mediadas por distintos tipos celulares, esenciales en la transmisión de señales a otras células o respondiendo a los distintos estímulos que se generan en una respuesta inmune. Por eso, en 159 de los 183 neonatos incluidos en el estudio, se analizaron por citometría de flujo en sangre de cordón umbilical los valores de linfocitos totales (CD45+), células T totales (CD45+CD3+), células T CD4+ (CD3+CD4+) y T CD8+ (CD3+CD8+), células NK (CD3-CD56+) y células B (CD45+CD19+), en número absoluto y en porcentaje. Se realizaron dos análisis diferentes:

- a) según grupos de edad gestacional: 1) **muy pretérmino** (25-30 semanas de gestación): n=23; 2) **pretérmino** (31-36 sem.): n=63; 3) **a término** (37-42 sem.): n=73.
- b) **semana a semana**, desde la semana 25 de gestación a la semana 41 (n=158; la semana 42 no se incluyó en el análisis por contar sólo con 1 caso) (*Tabla 5.5*).

Tabla 5.5. Distribución de los 158 neonatos incluidos en el estudio de poblaciones celulares T, B y NK, por semanas de gestación (*semana a semana*).

EG	25	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
n	2	3	3	11	4	6	14	9	9	13	12	12	13	15	14	18

Se compararon los valores de todas las poblaciones linfocitarias entre los grupos *muy pretérmino*, *pretérmino* y *a término*, encontrándose valores absolutos significativamente más altos de linfocitos totales (CD45+), células T totales (CD45+CD3+), células T CD4+ (CD3+CD4+), células NK (CD3-CD56+) y células B (CD45+CD19+) en el grupo *a término* (*Figura 5.2.A-D*). El grupo *muy pretérmino* tuvo

los valores absolutos y porcentajes de células NK significativamente más bajos que los otros dos grupos (*Figuras 5.2.C, 5.2.F*) y valores también más bajos en células B por mm^3 (*Figura 5.2.D*). En porcentajes de células T totales y células B sólo se encontraron diferencias significativas entre los grupos *pretérmino* y *a término* (*Figura 5.2.E*). No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de células T CD4+ y células T CD8+ entre ninguno de los 3 grupos estudiados.

En el análisis *semana a semana*, se calcularon las medianas y el rango intercuartílico (percentil 25 y percentil 75) de cada población celular, excepto para las semanas 25, 27, 28 y 30 (donde $n < 6$ y no se pudo calcular el rango intercuartílico), en las que se describió el valor mínimo y el valor máximo desde la semana 25 hasta la 41, en valores absolutos (*Tabla 5.6.a*) y en porcentajes (*Tabla 5.6.b*).

En las semanas 29 y 36, se encontraron valores absolutos significativamente más bajos de linfocitos totales (CD45+) que en cualquiera de las semanas *a término* (semanas 37 a 41 de gestación) (*Tabla 5.6.a*). También se encontraron valores absolutos significativamente más bajos de células T totales (CD45+CD3+) y células T CD4+ (CD3+CD4+) en las semanas 29 y 36 que en las semanas 37, 39 y 40 (*Tabla 5.6.a*). En cuanto a los valores absolutos de células T CD8+ (CD3+CD8+), fueron significativamente más bajos en la semana 36 que en las semanas 37 y 40 (*Tabla 5.6.a*). Los valores absolutos de células NK fueron significativamente más altos en la semana 41 que en el resto de las semanas gestacionales estudiadas, y también más altos en la semana 38 que en las semanas 29 y 36 (*Tabla 5.6.a*). Finalmente, los valores absolutos de células B fueron significativamente más bajos en las semanas 29, 33 y 36 que en las semanas 38, 39, 40 y 41 (*Tabla 5.6.a*).

Es interesante destacar que los porcentajes de células T CD3+ siguieron una tendencia muy similar a los de las células T CD4+, con valores significativamente más bajos en las semanas 38 y 41 (*Tabla 5.6.b*). Los porcentajes más altos de células T CD8+ se encontraron en la semana 33 (*Tabla 5.6.b*). En células NK, se observaron los porcentajes más altos en las semanas 38 y 41 (*Tabla 5.6.b*), al igual que en valores absolutos. En cuanto a los porcentajes de células B, los valores significativamente más bajos se observaron en las semanas 33 y 34 y los valores más altos en la semana 41 (*Tabla 5.6.b*).

Estos resultados sugerían un balance linfocitario diferente según la semana de nacimiento del neonato, con una inversión entre el periodo *pretérmino* y el periodo *a término*. Por eso, se calcularon los ratios CD4/CD8, CD3/NK y CD4/NK, en valores absolutos y en porcentajes, para cada grupo gestacional. No se encontraron diferencias significativas en el ratio CD4/CD8 entre los grupos *muy pretérmino*, *pretérmino* y *a término* (media %CD4 / %CD8 = 2,8, 2,9 y 2,9 respectivamente, y media (CD4/mm³) / (CD8/mm³) = 2,8 , 2,9 y 2,9 respectivamente). Sin embargo, los cocientes CD3/NK y CD4/NK fueron significativamente más altos en el grupo *muy pretérmino* que en el grupo *a término* (p=0,002, para CD3/NK; p=0,003, para CD4/NK, tanto en porcentajes como en valores absolutos).

Se administraron esteroides antenatales en 5 niños del grupo *muy pretérmino* y en 9 niños del grupo *pretérmino*. La pre-eclampsia materna se presentó en 5 casos del grupo *pretérmino* y en 1 caso del grupo *a término*. Al realizar el análisis estadístico excluyendo estos casos, se comprobó que los resultados del análisis de poblaciones linfocitarias fueron los mismos que si no se excluían dichos casos.

Figura 5.2. Diferencias significativas encontradas en las poblaciones linfocitarias entre los tres grupos gestacionales, *muy pretérmino* (≤ 30 semanas, $n=23$), *pretérmino* (31-36 sem., $n=63$) y *a término* (≥ 37 sem., $n=73$). (A) Linfocitos totales ($CD45+/mm^3$). (B) Células T totales ($CD45+CD3+$) y linfocitos T $CD4+$ ($CD3+CD4+$) en valores absolutos (células/ mm^3). (C) Células NK ($CD3-CD56+$) en valores absolutos (células/ mm^3). (D) Células B ($CD45+CD19+$), en valores absolutos (células/ mm^3). (E) Células T ($CD45+CD3+$) y linfocitos B ($CD45+CD19+$) en porcentajes. (F) Células NK ($CD3-CD56+$) en porcentajes. Las escalas de representación varían según se trate de valores absolutos o porcentajes.

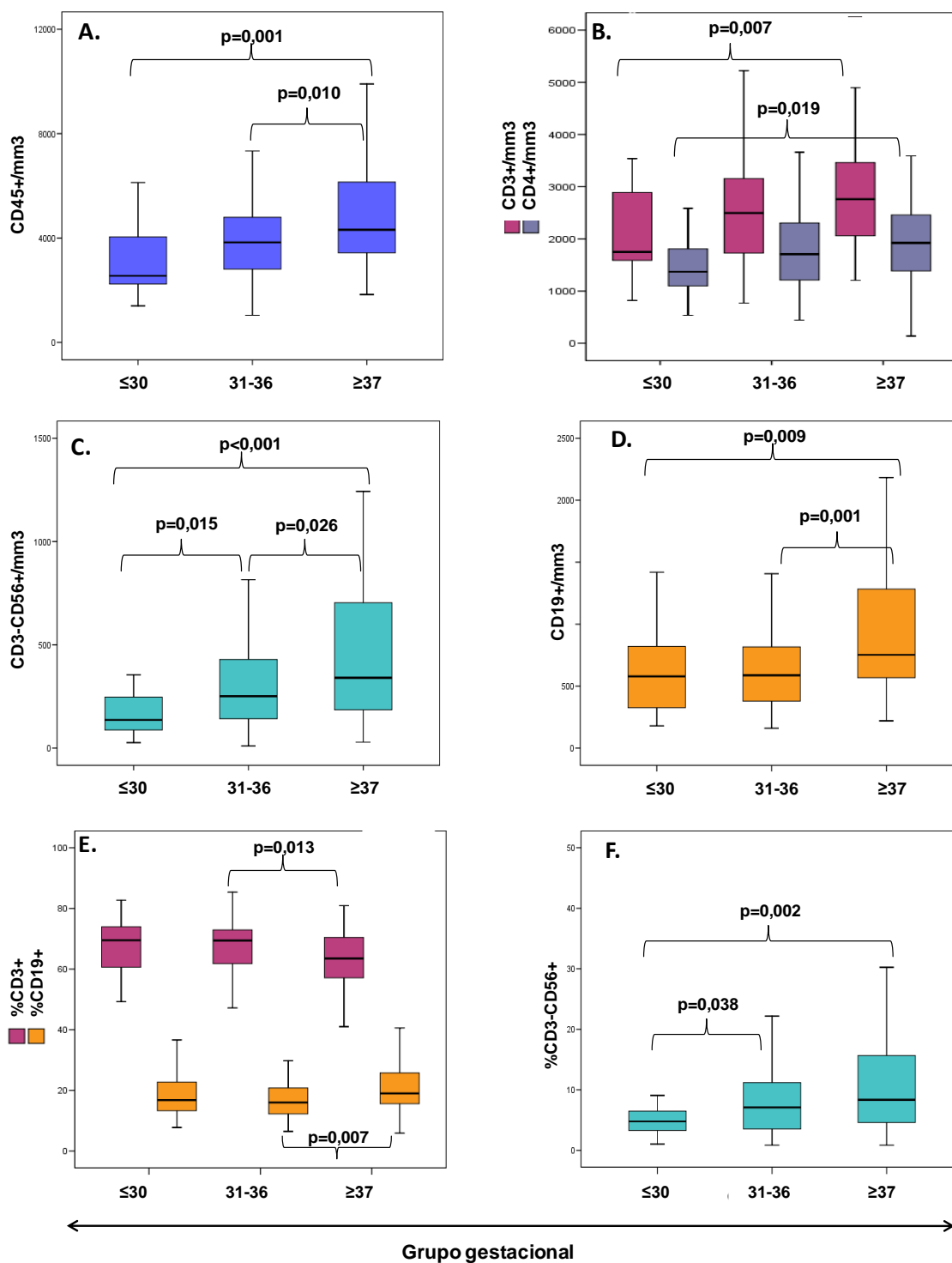


Tabla 5.6.a. Valores de referencia de linfocitos totales por mm³ y valores absolutos de células T, B y NK según la semana de gestación.

Edad gestacional (semanas)	N	Linfocitos tot. / mm ³	CD3+ / mm ³	CD4+ / mm ³	CD8+ / mm ³	NK / mm ³	B / mm ³
25	2	3599 (3211;3987)	2325 (1672;2978)	1798 (1374;2221)	543 (370;716)	136 (102;171)	999 (579;1419)
27	3	2551 (2273;2668)	1842 (1608;1882)	1210 (1088;1604)	448 (253;478)	77 (27;128)	423 (369;640)
28	3	3629 (2387;4103)	2614 (1548;2840)	1801 (1110;1813)	937 (392;1000)	167 (87;248)	608 (607;889)
29	11	2261 (2088;5799)[†]	1663 (1336;3538)	1283 (839;2586)	417 (329;906)	148 (88;325)	434 (241;752)[■]
30	4	4094 (2143;10446)	2344 (1613;5517)	1543 (1081;3614)	865 (405;1883)	198 (66;602)	700 (202;3562)
31	6	3592 (2757;4181)	2652 (1652;2732)	1874 (1112;2035)	634 (338;754)	181 (46;343)	649 (292;956)
32	13	4394 (2643;5303)	2708 (1654;3469)	1908 (1182;2900)	598 (372;741)	323 (159;467)	738 (499;1012)
33	7	3889 (1449;5157)	2730 (891;3639)	1706 (551;2377)	921 (311;1108)	247 (118;431)	468 (223;698)[■]
34	8	4532 (3353;5649)	2808 (1909;3839)	1921 (1295;2936)	762 (511;987)	411 (265;738)	621 (471;711)
35	13	3872 (2903;4938)	3084 (1695;3543)	2245 (1175;2643)	717 (507;934)	186 (78;423)	696 (426;1147)
36	12	2885 (2064;3756)^{††}	1960(1514;2498)[‡]	1311(1106;1777)[•]	484 (390;741)[▲]	178 (147;294)	479 (304;598)^{■■■}
37	12	4284 (3491;4663)	2936 (2732;3094)	2068 (1899;2201)	771 (667;869)	202 (110;438)	647 (451;729)
38	12	4271 (3198;4882)	2448 (1972;3379)	1542 (1277;2316)	712 (529;831)	403 (197;1090)[•]	807 (572;1250)
39	15	3934 (3132;6374)	2636 (1982;4381)	1991 (1497;3247)	596 (489;1144)	291 (152;466)	931 (583;2050)
40	13	4543 (3534;6872)	2776 (2162;4687)	2335 (1500;3201)	907 (515;1408)	470 (146;745)	1010 (522;2062)
41	17	4383 (2977;6505)	2255 (1880;3576)	1745 (1199;2311)	723 (461;960)	550 (288;959)^{••}	772 (568;1022)

Valores expresados como Mediana (p25;p75), excepto para las semanas 25, 27 y 28, en las que se expresó Mediana (Mínimo;Máximo). Diferencias estadísticamente significativas entre las distintas semanas de gestación. LINFOCITOS TOT. : **†**: 29 vs.39 (p=0.015), vs.40 (p=0.013), vs.41 (p=0.037); **††**: 36 vs.37 (p=0.014), vs.38 (p=0.020), vs.39 (p=0.004), vs.40 (p=0.005), vs.41 (p=0.008). CÉLULAS T TOT. : **‡**: 36 vs.37 (p=0.003), vs.39 (p=0.019), vs.40 (p=0.011); CÉLULAS T CD4: **•**: 36 vs.37 (p=0.014), vs.39 (p=0.010), vs.40 (p=0.019). CÉLULAS T CD8: **▲**: 36 vs.37 (p=0.014), vs.40 (p=0.019). CÉLULAS NK: **◆**: 38 vs.29 (p=0.011), vs.36 (p=0.012); **◆◆**: 41 vs.29 (p=0.002), vs.31 (p=0.012), vs.33 (p=0.038), vs.35 (p=0.029), vs.36 (p=0.003), vs.37 (p=0.017). CÉLULAS B: **■**: 29 vs.38 (p=0.037), vs.39 (p=0.015), vs.40 (p=0.037), vs.41 (p=0.024); **■■**: 33 vs.38 (p=0.022), vs.39 (p=0.014), vs.40 (p=0.028), vs.41 (p=0.009); **■■■**: 36 vs.32 (p=0.028), vs.35 (p=0.040), vs.38 (p=0.006), vs.39 (p=0.006), vs.40 (p=0.012), vs.41 (p=0.002).

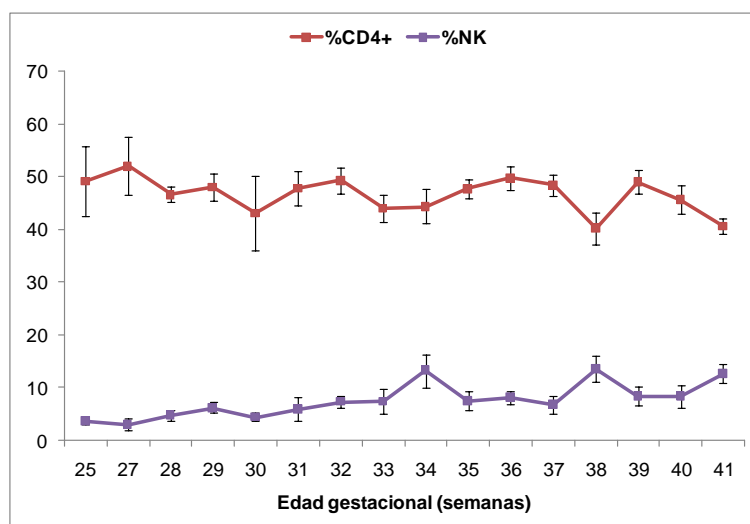
Tabla 5.6.b. Valores de referencia de porcentajes de células T, B y NK según la semana de gestación.

Edad gestacional (semanas)	N	% CD3+	% CD4+	% CD8+	% NK	% B
25	2	63,3 (51,9;74,7)	49,2 (42,7;55,7)	14,7 (11,5;18,0)	3,7 (3,2;4,3)	29,4 (14,5;44,2)
27	3	70,7 (69,0;73,8)	47,9 (45,4;62,9)	16,8 (9,9;21,0)	3,4 (1,0;4,8)	15,8 (14,5;28,2)
28	3	69,2 (64,9;71,5)	46,5 (44,2;49,2)	24,4 (16,5;25,6)	4,1 (3,7;6,8)	21,7 (16,8;25,4)
29	11	69,5 (60,2;78,5)	50,3 (39,8;55,5)	18,1 (14,5;26,1)	6,1 (2,8;7,9)	16,8 (11,9;22,4)
30	4	63,8 (50,3;77,4)	41,1 (30,5;57,8)	18,6 (16,2;25,1)	4,9 (3,0;5,7)	15,9 (9,3;32,2)
31	6	68,5 (61,3;73,2)	45,5 (40,8;56,6)	17,9 (15,2;23,0)	4,5 (2,6;8,9)	18,1 (11,7;22,9)
32	13	67,8 (57,9;75,1)	47,8 (42,4;57,2)	14,0 (11,0;20,9)	7,0 (4,7;10,9)	18,2 (12,4;22,8)
33	8	70,7 (62,6;71,9)	46,0 (38,8;48,4)	23,1 (21,4;25,7)[▲]	6,5 (2,0;11,0)	14,0 (10,3;18,3)[■]
34	8	60,9 (53,3;72,8)	41,0 (36,5;54,6)	15,1 (14,2;18,2)	11,4 (4,7;22,7)	14,2 (10,9;19,2)^{■●}
35	13	71,2 (61,6;72,7)	49,2 (42,7;53,1)	19,9 (14,8;23,1)	4,1 (2,6;12,4)	20,5 (10,5;28,2)
36	12	70,8 (65,6;73,9)	48,7 (43,8;54,5)	19,7 (14,7;21,5)	7,9 (5,2;10,0)	15,9 (12,7;18,2)
37	12	67,5 (61,4;76,5)	49,9 (42,5;53,9)	17,7 (14,8;22,2)	5,6 (2,0;9,9)	15,3 (12,3;18,5)
38	12	60,4 (47,1;67,9)[‡]	41,4 (30,4;50,9)[●]	16,4 (13,7;20,4)	13,3 (6,1;18,6)[♦]	19,3 (15,3;25,4)
39	15	67,2 (57,5;74,9)	50,6 (43,4;55,9)	15,6 (11,0;19,9)	6,8 (4,5;12,4)	22,6 (16,0;34,3)
40	13	63,5 (58,2;75,4)	44,4 (39,8;50,6)	17,6 (14,5;20,7)	6,3 (2,5;15,6)	18,1 (14,6;25,3)
41	18	57,8 (51,2;64,2)^{‡‡}	43,1 (35,6;44,2)^{●●}	16,0 (11,1;18,9)	10,7 (6,0;20,6)^{♦♦}	20,3 (16,8;26,9)^{■●●}

Valores expresados como Mediana (p25;p75), excepto para las semanas 25, 27 y 28, en las que se expresó Mediana (Mínimo;Máximo). Diferencias estadísticamente significativas entre las distintas semanas de gestación. CÉLULAS T TOT.: ‡: 38 vs.29 (p=0.027), vs.33 (p=0,031), vs.35 (p=0,007), vs.36 (p=0,008), vs.37 (p=0,024); ‡‡: 41 vs.29 (p=0,016), vs.31 (p=0.022), vs.32 (p=0.046), vs.33 (p=0.009), vs.35 (p=0.012), vs.36 (p=0.001), vs.37 (p=0.005), vs.39 (p=0.030), vs.40 (p=0.038). CÉLULAS T CD4: ●: 38 vs.32 (p=0,030), vs.36 (p=0,039); ●●: 41 vs.29 (p=0.012), vs.32 (p=0,006), vs.35 (p=0,014), vs.36 (p=0,003), vs.37 (p=0.004), vs.39 (p=0,003). CÉLULAS T CD8: ▲: 33 vs.32 (p=0,006), vs.34 (p=0,003), vs.36 (p=0,010), vs.37 (p=0,047), vs.38 (p=0,012), vs.39 (p=0,001), vs.40 (p=0,020), vs.41 (p=0,001). CÉLULAS NK: ♦: 38 vs.29 (p=0,023), vs.37 (p=0.033); ♦♦: 41 vs.29 (p=0,017), vs.31 (p=0.044), vs.35 (p=0.035), vs.37 (p=0.018). CÉLULAS B: ■: 33 vs.38 (p=0,031), vs.39 (p=0,047); ■■: 34 vs.38 (p=0,047); ■■■: 41 vs.33 (p=0,003), vs.34 (p=0,009), vs.36 (p=0,006), vs.37 (p=0,028).

Al analizar la relación entre la edad gestacional y las poblaciones celulares, se observó una asociación lineal significativa entre la edad gestacional y el porcentaje de células T totales (CD45+CD3+) ($R = -0,225$; $p = 0,005$) y entre la edad gestacional y el porcentaje de células T CD4+ (CD3+CD4+) ($R = -0,177$; $p = 0,028$). También se observó una correlación significativa entre la edad gestacional y el porcentaje de células NK (CD3-CD56+) ($R = +0,275$; $p = 0,001$). Además, al analizar la relación entre el porcentaje de células T CD4+ y el porcentaje de células NK, se observó una correlación significativa ($R = -0,423$; $p < 0,001$), una inversión en el balance entre los linfocitos T CD4+ y las células NK desde el periodo *pretérmino* al periodo *a término* (Figura 5.3).

Figura 5.3. Porcentajes de linfocitos T CD4+ y células NK *semana a semana* a lo largo de todo el periodo gestacional estudiado. Se observó una correlación negativa y significativa ($R = -0,423$; $p < 0,001$) entre ambas poblaciones celulares, dándose una inversión en el balance CD4 vs. NK desde el periodo *pretérmino* al periodo *a término*, con valores mínimos de células T CD4+ y valores máximos de células NK en las semanas 38 y 41 de gestación.



5.3. CÉLULAS B.

El estudio del desarrollo del brazo humoral con la edad gestacional, por semanas de gestación (*semana a semana*) y por grupos gestacionales (*muy pretérmino, pretérmino y a término*), se realizó mediante un análisis de las subpoblaciones de células B, por citometría de flujo. Se cuantificaron los valores de inmunoglobulinas en el plasma de los neonatos, como medida de los anticuerpos sintetizados por los linfocitos B neonatales y de la capacidad de estos de producir anticuerpos que reconozcan antígenos extraños. Por último, se determinó la variabilidad del repertorio de células B, a través de la variabilidad de la cadena H del receptor de células B mediante un análisis de fragmentos por electroforesis capilar.

5.3.1. SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS B.

El análisis de las subpoblaciones de células B se realizó por citometría de flujo en sangre de cordón umbilical en 125 de los 183 neonatos incluidos en el estudio y se determinó la variación de cada subpoblación a lo largo del periodo gestacional estudiado, por semanas de gestación (*semana a semana*) y por grupos gestacionales (*muy pretérmino, pretérmino y a término*) (Tabla 5.7.).

Tabla 5.7. Número de muestras por semanas de gestación que se incluyeron en el análisis de subpoblaciones de células B.

EG	25	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
n	2	3	3	11	2	3	6	6	6	11	10	9	11	14	9	18	1

EG: edad gestacional (semanas), n: nº neonatos por cada semana de gestación.

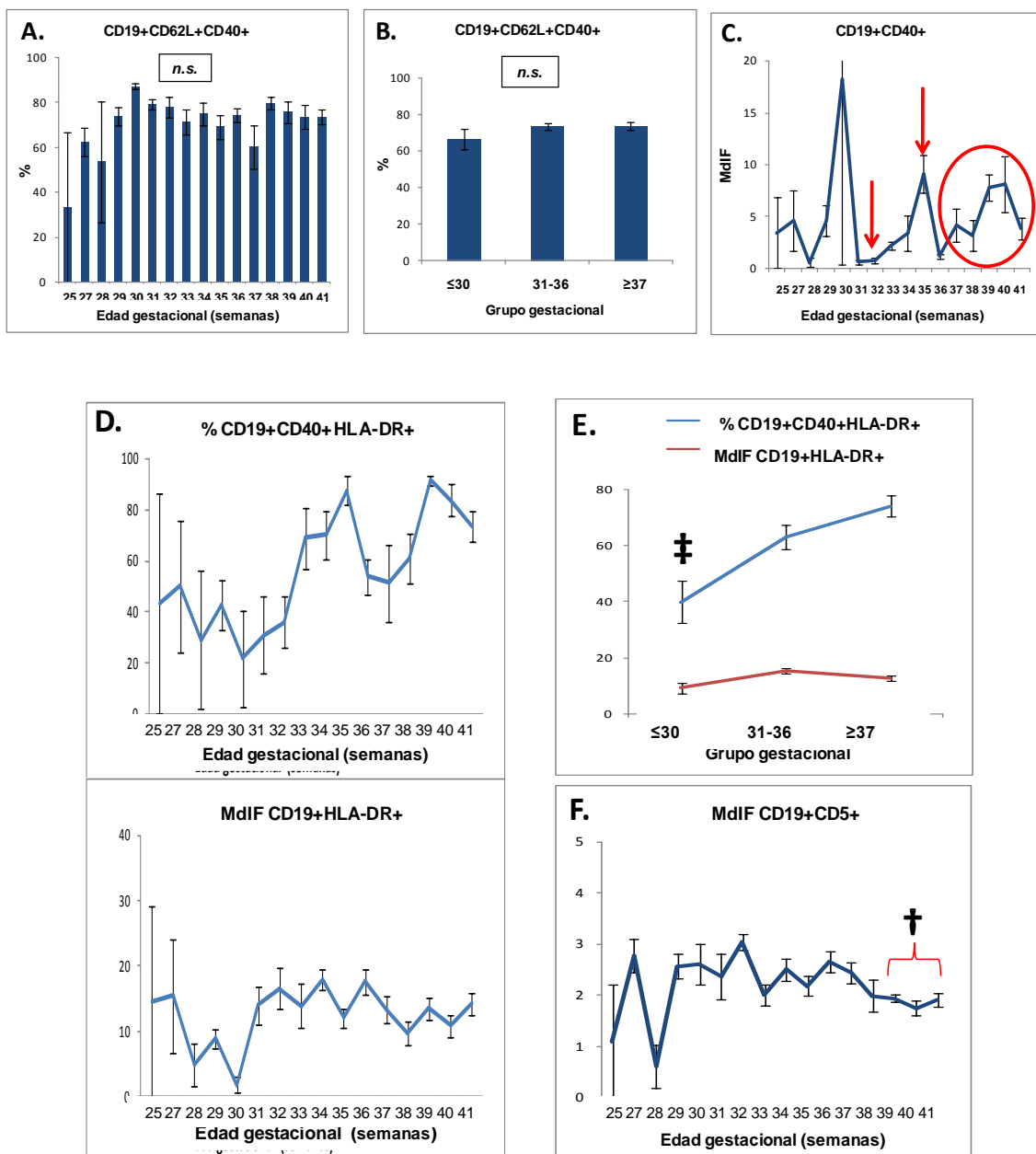
La distribución de los neonatos por grupos gestacionales fue: *muy pretérmino* (≤ 30 semanas), n=21; *pretérmino* (31-36 semanas), n=42; *a término* (≥ 37 semanas), n=62.

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de la subpoblación de células B con capacidad de migrar a ganglio y funcionales (CD19+CD62L+CD40+), ni *semana a semana* (Figura 5.4.A) ni por grupos de edad gestacional (Figura 5.4.B). Sin embargo, se observó una cantidad variable a lo largo de todo el periodo estudiado de células B con capacidad de activarse (MdIF CD19+CD40+), cuando se realizó el estudio *semana a semana* (Figura 5.4.C), pero con valores opuestos a los observados en el análisis de las células T inmaduras (ver Figura 5.14).

Los porcentajes de células B presentadoras de antígeno (CD19+CD40+HLA-DR+, MdIF CD19+HLA-DR+) aumentaron según aumentó la edad gestacional hasta la semana 35 de gestación, para descender en las semanas 36 y 37 (al inicio del periodo *a término*) y volver a aumentar de nuevo a partir de la semana 38 de gestación hasta el final del periodo estudiado (Figura 5.4.D). Sin embargo, en el análisis de esta subpoblación por grupos gestacionales, se observaron valores significativamente más bajos en el grupo *muy pretérmino* y un incremento en los grupos *pretérmino* y *a término* (Figura 5.4E).

Finalmente, las células B que expresan el marcador CD5+, o poblaciones inmaduras, tuvieron una proporción constante hasta la semana 37, en la que comenzaron un descenso hasta llegar a los valores más bajos en las tres últimas semanas *a término*, encontrándose diferencias significativas con el resto de semanas de gestación del periodo estudiado (Figura 5.4.F).

Figura 5.4. Subpoblaciones de linfocitos B. Células B con capacidad de migrar a ganglio (CD62L+) y funcionales (CD40+), *semana a semana* (A) y por grupos de edad gestacional (B). (C) Evolución de la capacidad de activación, medida como la MdIF de la expresión del marcador CD40: se observó el valor más bajo en la semana 32 y el más alto en la 35, con diferencias significativas con el resto de semanas ($p<0,05$), y un aumento progresivo desde la semana 37. Células B presentadoras de antígeno (HLA-DR+), *semana a semana* (D) y por grupos e edad gestacional (E). (F) Subpoblación inmadura, especial en niños, con el marcador de superficie CD5+. (*n.s.*), no significación estadística. (‡) Diferencias significativas del grupo ≤ 30 con 31-36 ($p=0,010$) y con ≥ 37 ($p<0,001$). (†) Diferencias significativas de las semanas 39, 40 y 41 con todas las demás semanas de gestación ($p<0,05$).



Se determinaron los valores de referencia en porcentajes de las subpoblaciones de células B descritas, *semana a semana* de gestación y por grupos gestacionales (*muy pretérmino, pretérmino y a término*) (Tabla 5.8).

Tabla 5.8. Valores de referencia en porcentajes de las subpoblaciones de células B, por semanas de gestación (*semana a semana*) y por grupos gestacionales (≤ 30 o *muy pretérmino*, 31-36 o *pretérmino* y ≥ 37 o *a término*).

Edad gestacional (semanas)	N	CD19+CD62L+CD40+		CD19+CD40+HLA-DR+		CD19+CD5+HLA-DR+		CD19+CD5+CD40+	
		Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)
25	2	33,4	(0 ; 66,9)	43,1	(0 ; 86,3)	27,6	(0 ; 55,2)	27,0	(0 ; 54,0)
27	3	63,8	(50,7 ; 72,6)	47,9	(6,7 ; 95,6)	47,9	(2,7 ; 73,4)	6,7	(4,4 ; 47,6)
28	3	74,0	(0,0 ; 86,9)	4,0	(0 ; 83,2)	4,3	(0 ; 55,0)	3,0	(0 ; 4,5)
29	11	72,9	(65,2 ; 86,8)	39,0	(12,4 ; 66,7)	57,2	(37,5 ; 66,3)	28,5	(9,0 ; 45,2)
30	2	87,5	(86,0 ; 89,0)	21,8	(2,8 ; 40,8)	44,3	(24,3 ; 64,4)	17,7	(2,6 ; 32,8)
31	3	81,2	(75,1 ; 81,9)	20,6	(11,3 ; 61,2)	55,8	(50,9 ; 69,6)	9,1	(8,9 ; 34,8)
32	6	82,4	(69,1 ; 85,6)	32,8	(16,6 ; 59,7)	74,9	(69,1 ; 78,3)	23,5	(9,9 ; 41,1)
33	6	67,2	(59,5 ; 85,9)	78,6	(54,9 ; 86,6)	53,0	(43,3 ; 59,6)	38,5	(27,1 ; 49,9)
34	6	77,8	(70,2 ; 81,1)	67,5	(47,0 ; 97,0)	70,9	(57,6 ; 74,2)	41,6	(26,4 ; 70,8)
35	11	72,5	(60,2 ; 80,8)	95,0	(87,0 ; 97,4)	61,3	(54,9 ; 64,7)	55,0	(49,1 ; 65,2)
36	10	76,8	(66,1 ; 80,5)	54,0	(45,2 ; 66,7)	66,1	(58,8 ; 74,5)	35,9	(29,8 ; 41,9)
37	9	71,5	(41,9 ; 79,4)	62,3	(5,7 ; 95,5)	54,5	(43,1 ; 81,0)	24,2	(4,7 ; 55,0)
38	11	81,8	(76,1 ; 85,5)	68,5	(40,3 ; 93,3)	59,6	(7,4 ; 72,6)	35,1	(3,2 ; 65,4)
39	14	79,2	(72,1 ; 84,6)	95,2	(85,7 ; 98,0)	50,3	(43,8 ; 55,1)	49,7	(39,2 ; 54,8)
40	9	71,9	(61,7 ; 91,2)	93,5	(67,9 ; 96,0)	45,6	(32,7 ; 59,0)	45,6	(22,5 ; 52,4)
41	18	74,1	(61,1 ; 86,5)	79,9	(56,7 ; 95,8)	48,6	(41,1 ; 62,1)	39,7	(25,6 ; 46,3)
Grupo gestacional	N	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)
≤ 30	21	72,6	(61,4 ; 86,4)	39,0	(4,4 ; 74,6)	47,9	(25,4 ; 64,3)	9,4	(3,6 ; 44,0)
31-36	42	76,8	(63,8 ; 82,3)	66,9	(43,6 ; 90,6)	63,9	(55,0 ; 72,4)	37,4	(24,9 ; 50,8)
≥ 37	62	76,3	(68,7 ; 85,4)	86,3	(61,9 ; 95,7)	51,7	(41,1 ; 62,3)	40,6	(23,3 ; 53,5)

Se describen los valores como Mediana (percentil 25 ; percentil 75), excepto para las semanas 25, 27, 28, 30 y 31, en las que se expresan en Mediana (mínimo ; máximo), debido al pequeño tamaño muestral ($n < 6$). Se han resaltado en negrita los valores con diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al resto de semanas de gestación.

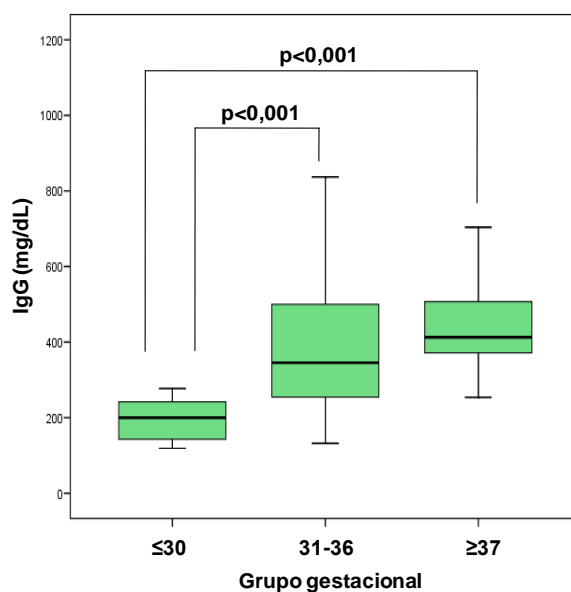
5.3.2. INMUNOGLOBULINAS.

Se cuantificó la concentración de inmunoglobulinas (Ig), IgG, IgA e IgM, presentes en el plasma de 60 de los 183 neonatos incluidos en el estudio (20 neonatos del grupo *muy pretérmino*, 20 del grupo *pretérmino* y 20 del grupo *a término*).

No se obtuvieron valores detectables de IgA ni de IgM en ninguna de las 60 muestras de plasma en las que se cuantificaron estas proteínas.

En cuanto a los valores de IgG, se observó que la cantidad de esta Ig se incrementó al aumentar la edad gestacional, encontrándose diferencias significativas del grupo *muy pretérmino* con los otros dos grupos gestacionales (*Figura 5.5*). Además, al analizar la correlación entre la cantidad de IgG y la edad gestacional, se observó que existía una asociación lineal ($R=0,738$; $p<0,001$).

Figura 5.5. Valores de IgG (mg/dL) en los distintos grupos gestacionales (≤ 30 semanas o *muy pretérmino*, 31-36 sem. o *pretérmino* y ≥ 37 sem. o *a término*). Se observó un aumento de la cantidad de IgG al aumentar la edad gestacional, siendo los valores detectados en las muestras del grupo *muy pretérmino* significativamente más bajos que en los otros dos grupos gestacionales.



5.3.3. VARIABILIDAD DEL REPERTORIO DE CÉLULAS B: ESTUDIO DEL BCR-V_H.

En células B aisladas de la sangre de cordón umbilical de 22 de los 183 neonatos incluidos en esta Memoria, divididos en 2 grupos según su edad gestacional (*pretérmino*, n=11; *a término*, n=11) (Tabla 5.9), se realizó el análisis de la variabilidad de las 6 subfamilias génicas de la parte variable (V) de la cadena pesada (H) del receptor de células B (BCR o *B cell receptor*) (BCR-V_H).

Tabla 5.9. Distribución de los 22 neonatos incluidos en el estudio del BCR-V_H, divididos según la semana gestacional de nacimiento. Para esta parte del estudio, se hicieron dos grupos gestacionales, < 37 semanas de gestación y ≥ 37 semanas.

	< 37 semanas (n=11)								≥ 37 semanas (n=11)				
Semana gestacional	25	27	29	30	33	34	35	36	37	38	39	40	41
Nº.muestras	1	1	1	1	1	2	3	1	1	2	3	4	1

5.3.3.1. Verificación de la técnica.

En primer lugar, se comprobó que las condiciones para la amplificación del ADN complementario (ADNc) obtenido a partir de ARN de células B (temperatura de anillamiento de los *primers*, tiempos de cada ciclo, número de ciclos de amplificación y secuencias de *primers*) eran las óptimas para obtener los productos de amplificación esperados. En la *Figura 5.6.* se muestran los productos de amplificación de las 6 subfamilias de la cadena H del BCR, en un neonato nacido en la semana 41 de gestación (grupo *a término*).

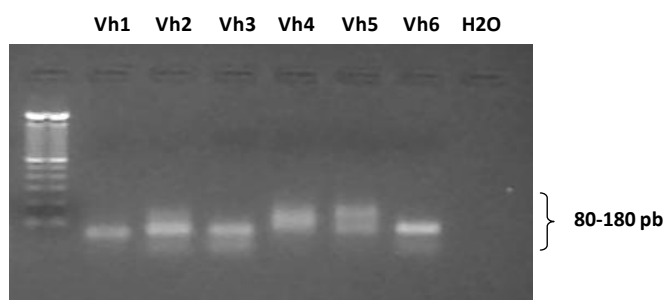
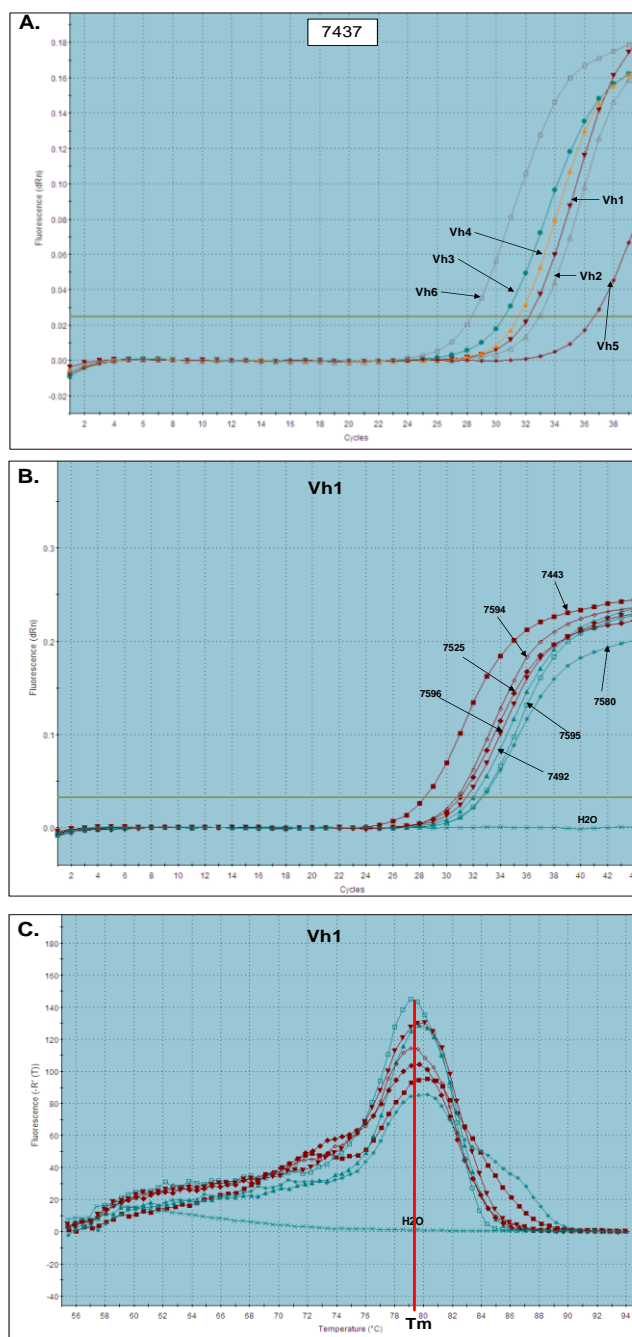


Figura 5.6. Productos de amplificación de las subfamilias del BCR de un neonato nacido *a término* (sem.41). Las 6 subfamilias del BCR se expresaron y podían detectarse de una manera cualitativa en un gel de agarosa al 2%.

5.3.3.2. Expresión de subfamilias V_H.

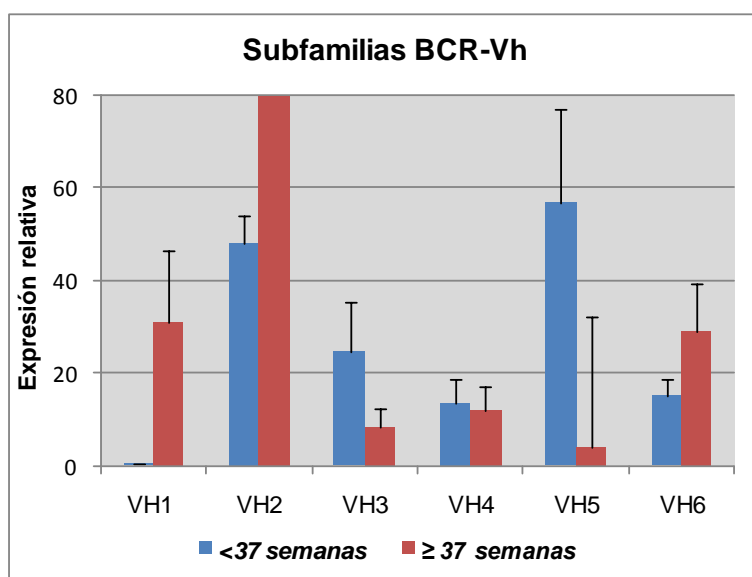
Se diseñó una PCR cuantitativa para determinar la expresión o no expresión de cada una de las subfamilias del BCR-V_H. Se observó que todas las subfamilias que se expresaron para un mismo niño lo hicieron en diferentes cantidades (*Figura 5.7.A*) y que la misma subfamilia se expresó en diferente cantidad entre neonatos nacidos en diferentes semanas gestacionales (*Figura 5.7.B*). Además, los productos de amplificación de una subfamilia, obtenidos para distintos neonatos, correspondieron al mismo fragmento, tal y como se comprobó en las “curvas de disociación” o “curvas de *melting*” (*Figura 5.7.C*).

Figura 5.7. Descripción de la PCR cuantitativa, diseñada para determinar la expresión o no expresión de las 6 subfamilias de la cadena H del BCR. (A) Plot de amplificación de todas las subfamilias del niño 7437, nacido en semana 41 de gestación. (B) Expresión de la subfamilia V_H1 en neonatos de diferentes edades gestacionales (3 *pretérmino* y 4 *a término*). (C) Curvas de disociación de la subfamilia V_H1 en 3 neonatos *pretérmino* y 4 neonatos *a término*.



Al analizar la expresión de todas las subfamilias por grupos gestacionales (<37 semanas y ≥ 37 semanas), se observó que la expresión relativa de las subfamilias V_{H3} , V_{H4} y V_{H5} era mayor para el grupo de neonatos *pretérmino* y las subfamilias V_{H1} , V_{H2} y V_{H6} tuvieron una expresión mayor en el grupo de neonatos ≥ 37 semanas (Figura 5.8).

Figura 5.8. Diferencias en la expresión de las 6 subfamilias V_H del BCR, según grupos gestacionales. El grupo ≥ 37 semanas (n=11) tuvo una expresión relativa mayor de las subfamilias V_{H1} , V_{H2} y V_{H6} , mientras que el grupo <37 semanas (n=11) presentó mayor expresión relativa de las subfamilias V_{H3} , V_{H4} y V_{H5} , aunque las diferencias no fueron significativas.

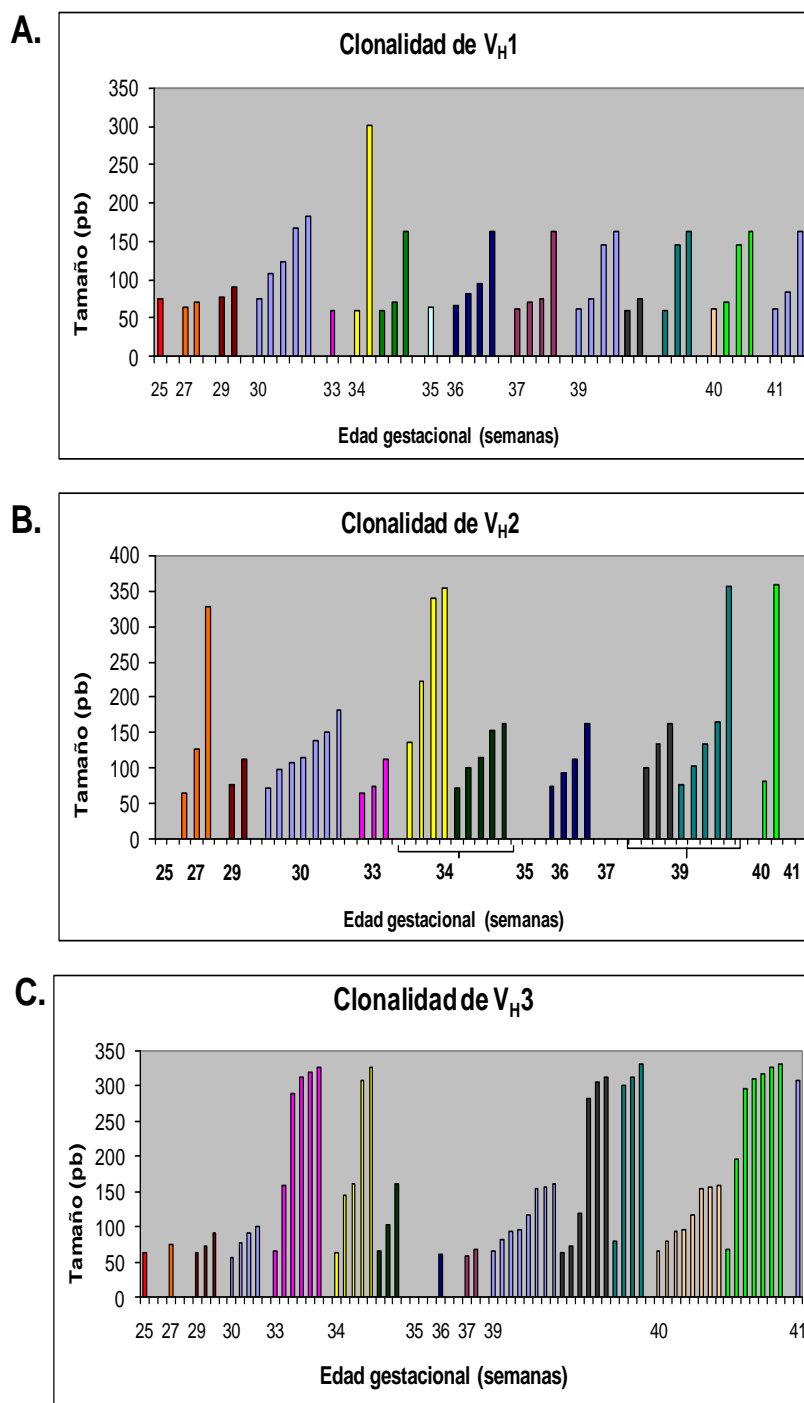


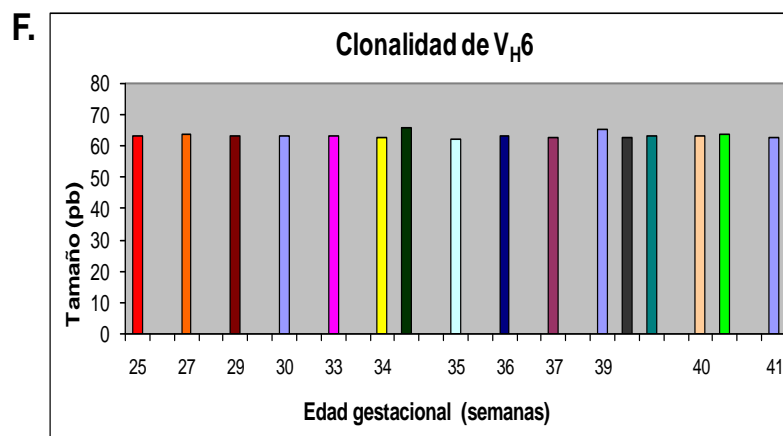
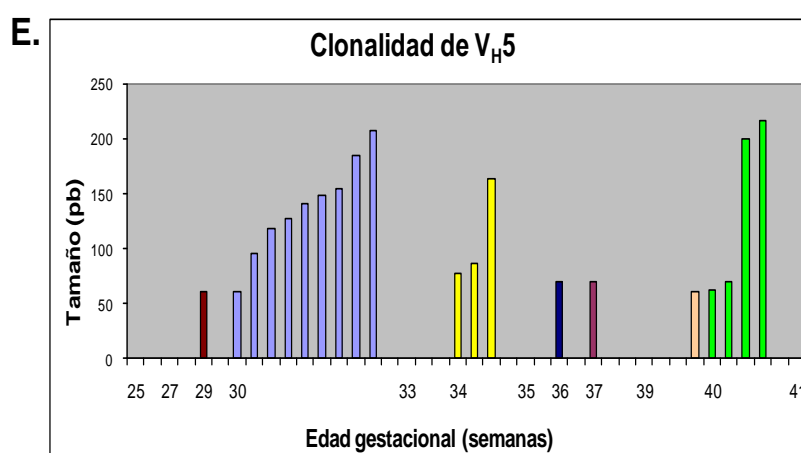
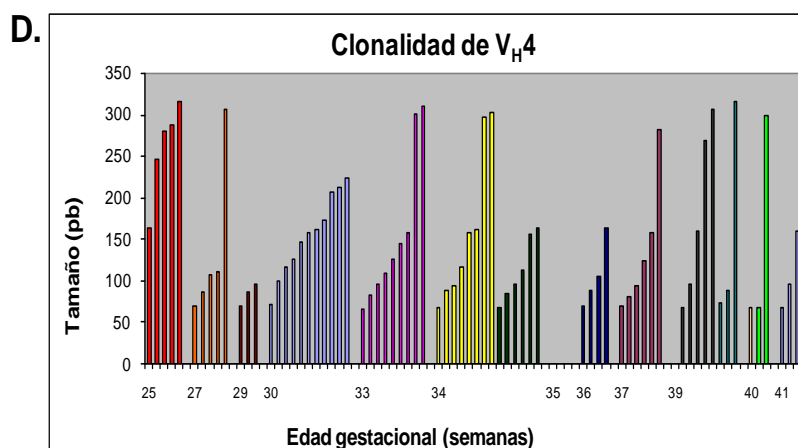
5.3.3.3. Clonalidad de subfamilias génicas V_H del BCR.

Tras conocer las subfamilias que se expresaban en cada neonato y con el objetivo de determinar su clonalidad, se realizó un análisis de fragmentos por electroforesis capilar de cada subfamilia.

Para las subfamilias V_H1 (*Figura 5.9.A*) y V_H2 (*Figura 5.9.B*), se observó que en las semanas *muy pretérmino* (25 a 30) y en las semanas *a término* (37 a 41) hubo un mayor número de clones que en las semanas 33-34. En cuanto a las subfamilias V_H3 (*Figura 5.9.C*) y V_H4 (*Figura 5.9.D*), se observó un gran número de clones en todas las semanas de gestación. Los clones de la subfamilia V_H5 sólo se observaron en las semanas de gestación 29, 30, 34, 36, 37 y 40, encontrándose el mayor número de ellos en las semanas 30 y 40 (*Figura 5.9.E*). Por último, los clones encontrados en la subfamilia V_H6 tuvieron el mismo tamaño en todas las semanas de gestación y fue más pequeño que en cualquiera de las otras subfamilias (*Figura 5.9.F*).

Figura 5.9. Clonalidad de subfamilias V_H del BCR por semanas de gestación. (A) V_{H1} . (B) V_{H2} . (C) V_{H3} . (D) V_{H4} . (E) V_{H5} . (F) V_{H6} . Cada barra representa un clon, con una longitud o tamaño de fragmento determinado. Cada color representa un neonato diferente. Para las subfamilias V_{H1} y V_{H2} , se observó una clonalidad muy heterogénea a lo largo de las semanas gestacionales, mientras que para las subfamilias V_{H3} y V_{H4} , la clonalidad fue muy alta a lo largo de todo el periodo. Sin embargo, la subfamilia V_{H5} sólo presentó clones en algunas semanas de gestación y la subfamilia V_{H6} presentó el mismo tamaño en los clones encontrados para todas las semanas de gestación estudiadas.





5.4. CÉLULAS T.

5.4.1. FUNCIÓN TÍMICA.

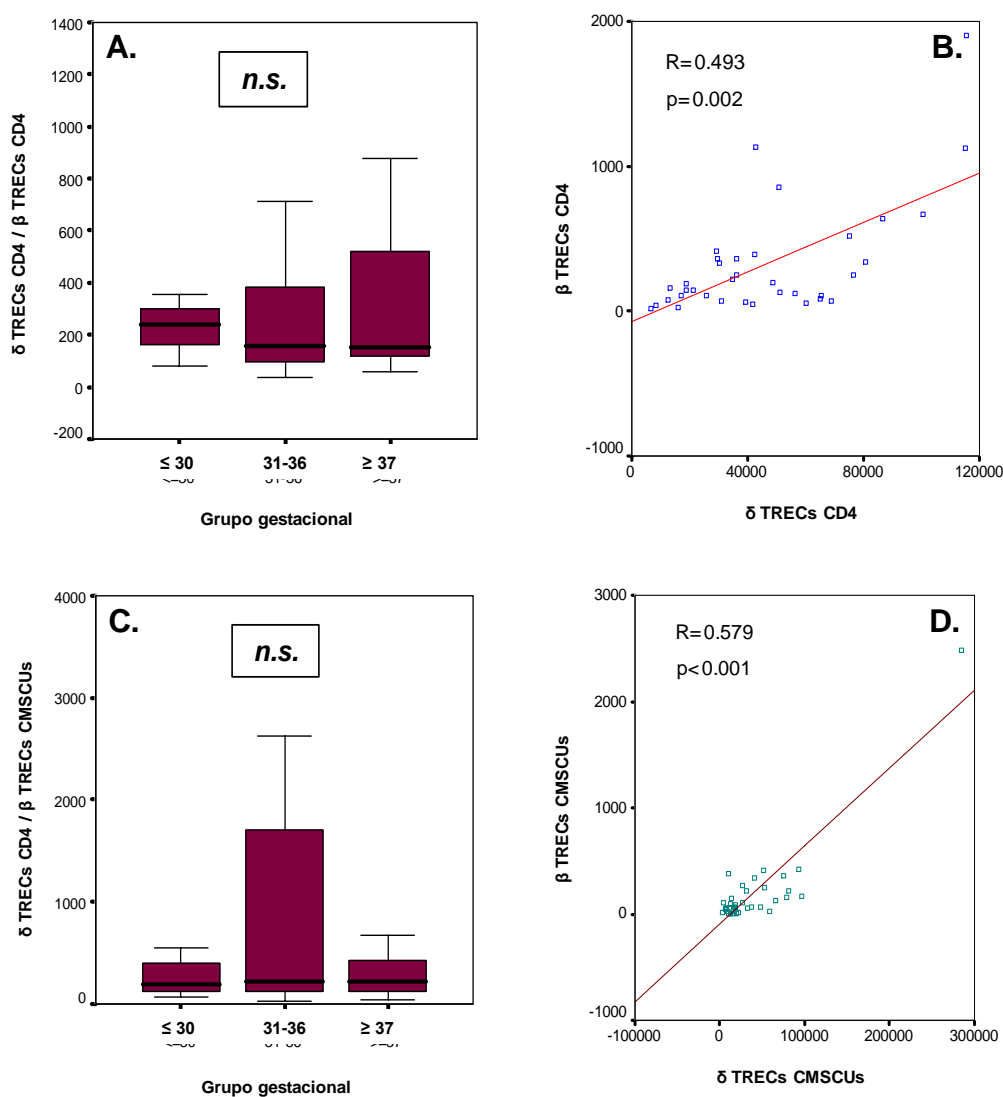
Para estudiar el desarrollo de la función tímica con la edad gestacional, por semanas de gestación (*semana a semana*) y por grupos gestacionales (*muy pretérmino*, *pretérmino* y *a término*), se analizó la proliferación intratímica por PCR cuantitativa a tiempo real mediante el cálculo del ratio δ TREC/ β TREC, como medida de la cantidad de células T formadas en el timo. También se determinaron, mediante técnicas de ELISA, los valores plasmáticos de dos citocinas implicadas en la maduración de los timocitos, la interleucina (IL)-7 y la linfopoyetina del estroma tímico o TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*). Se determinó la variabilidad del repertorio de células T, a través de la variabilidad de la cadena β del receptor de células T mediante un análisis de fragmentos por electroforesis capilar. Por último, y para dar continuidad con el estudio de subpoblaciones de células T, se analizaron las subpoblaciones de células T inmaduras o T virgen por citometría de flujo, como medida de la cantidad de células T recién salidas del timo.

5.4.1.1. Ratio δ TRECs / β TRECs.

Para analizar la capacidad del timo de generar nuevas células T, se determinó el cociente entre los sj- o δ TRECs (*signal joint* o *delta* TRECs) y los β TRECs (*beta* TRECs) o “proliferación intratímica”, por PCR cuantitativa a tiempo real, en células mononucleares de sangre de cordón umbilical (CMSCUs) de 47 neonatos de los 183 incluidos en esta Memoria (8 *muy pretérmino*, 26 *pretérmino* y 13 *a término*), y en células T CD4⁺ purificadas de las CMSCUs de 36 neonatos de los 183 incluidos en el estudio (3 *muy pretérmino*, 14 *pretérmino* y 19 *a término*). No se encontraron diferencias significativas en el cociente δ/β TRECs entre los tres grupos de neonatos, ni

para las CMSCUs ni para las células T CD4+ purificadas (Figura 5.10.A,B). Además, en los dos casos se observó una asociación positiva entre los δ TRECs y los β TRECs (Figura 5.10.C,D).

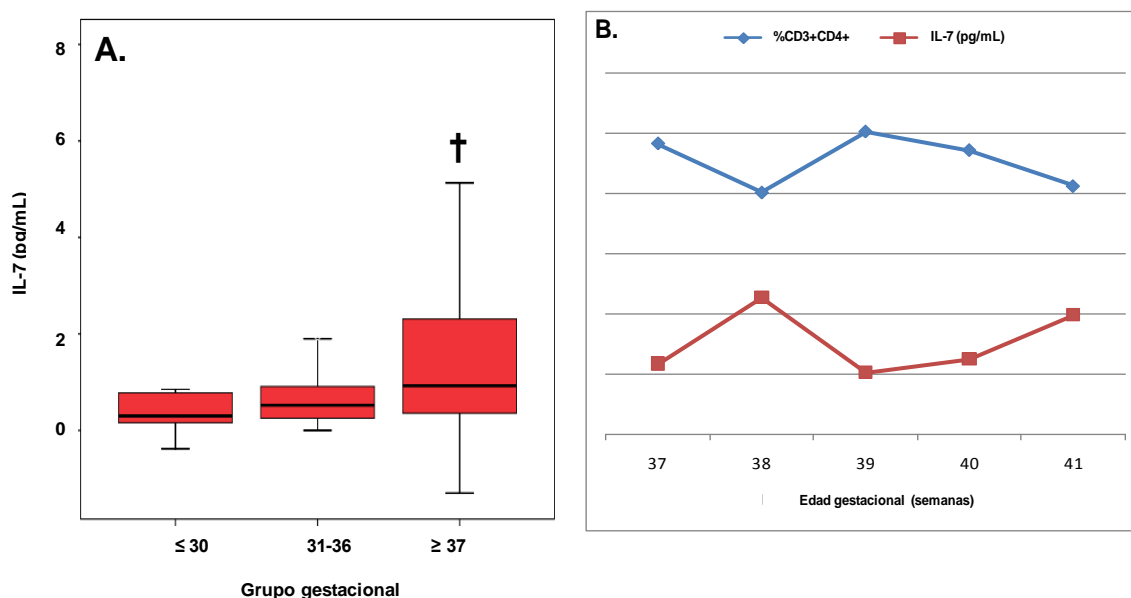
Figura 5.10. Ratio δ TRECs/ β TRECs por grupos gestacionales (≤ 30 semanas o muy pretérmino, 31-36 sem. o pretérmino y ≥ 37 sem. o a término), (A) en células T CD4+, (C) en CMSCUs. (n.s.), no significación estadística. Asociación lineal entre los delta y los beta TRECs, (B) en células T CD4+, (D) en CMSCUs.



5.4.1.2. Interleucina-7.

La IL-7 participa en la proliferación y maduración de las células T, proporcionando señales para la supervivencia de los precursores de los timocitos. Para analizar el papel en el desarrollo de células T en neonatos sanos, se cuantificaron los valores de IL-7 en plasma procedente de 153 neonatos de los 183 incluidos en el estudio, de los que 23 eran *muy pretérmino*, 62 *pretérmino* y 68 *a término*. La *Figura 5.11.A* muestra que el grupo de neonatos *a término* tuvo valores significativamente más altos de IL-7 que los otros dos grupos. Este aumento de IL-7 en plasma con la edad gestacional se confirmó al obtener significación en la correlación entre las dos variables, edad gestacional e IL-7 ($R=0,260$; $p=0,001$). Además, cuando se observó la alta dispersión de los datos en el grupo *a término* (≥ 37 semanas), se realizó un análisis *semana a semana* desde la semana 37 a la semana 41 de gestación y se observó que los valores de IL-7 plasmática disminuyeron al aumentar el porcentaje de células T CD4+ durante ese periodo y viceversa (*Figura 5.11.B*), aunque no se encontró una correlación significativa entre las dos variables inmunológicas ($R= -0,105$; $p=0,205$).

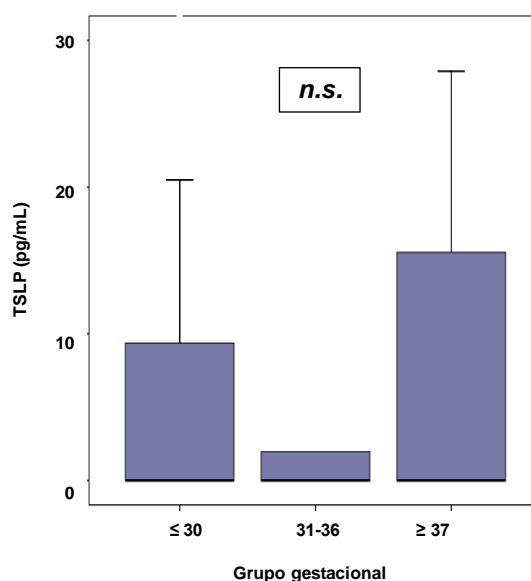
Figura 5.11. Producción de la citocina IL-7, medida en el plasma de la sangre de cordón de neonatos de distintas edades gestacionales. **(A)** Valores de IL-7 (pg/mL) por grupos gestacionales: ≤ 30 semanas o muy pretérmino (n=23), 31-36 sem. o pretérmino (n=62) y ≥ 37 sem. o a término (n=68). (†), ≥ 37 vs. ≤ 30 (p=0,007), ≥ 37 vs. 31-36 (p=0,008). **(B)** Variación de los valores de IL-7 y del porcentaje de células T CD4+ a lo largo del último tramo de la gestación (desde la semana 37 a la 41). Se observó un descenso en la producción de IL-7 cuando el porcentaje de células T CD4+ aumentó, aunque no fue una correlación significativa (R= -0,105; p=0,205).



5.4.1.3. Linfopoyetina del estroma tímico.

Se cuantificaron los valores de TSLP en plasma procedente de 78 neonatos de los 183 incluidos en el estudio, de los que 23 procedían de neonatos *muy pretérmino*, 30 *pretérmino* y 25 de neonatos *a término*. Un 60% de las muestras tuvieron valores plasmáticos de TSLP por debajo del límite de detección de la técnica y en las muestras en las que se obtuvo un valor detectable (11 de neonatos *muy pretérmino*, 9 *pretérmino* y 11 *a término*) no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos de neonatos (Figura 5.12). Sin embargo y de mayor interés, se encontró una asociación positiva y significativa entre los valores plasmáticos de TSLP y el porcentaje de células T CD4+ (R=0,243; p=0,031).

Figura 5.12. Valores plasmáticos de TSLP por grupos gestacionales (≤ 30 semanas o muy pretérmino, 31-36 sem. o pretérmino y ≥ 37 sem. o a término). (*n.s.*), no significación estadística.



5.4.1.4. Variabilidad del repertorio de células T: estudio del TCR-V β .

Se estudiaron las 24 subfamilias génicas de la cadena β de la parte variable (V) del receptor de células T (TCR o *T cell receptor*) (TCR-V β) en células T CD4+ y células T CD8+ aisladas de la sangre de cordón de 25 de los 183 neonatos incluidos en esta Memoria, divididos en dos grupos (<37 semanas y ≥ 37 semanas) y distribuidos por edad gestacional (*Tabla 5.10*):

Tabla 5.10. Relación de neonatos, según semana de gestación y según grupo gestacional (<37 semanas y ≥ 37 semanas), en los que se hizo el estudio de la variabilidad del repertorio de células T.

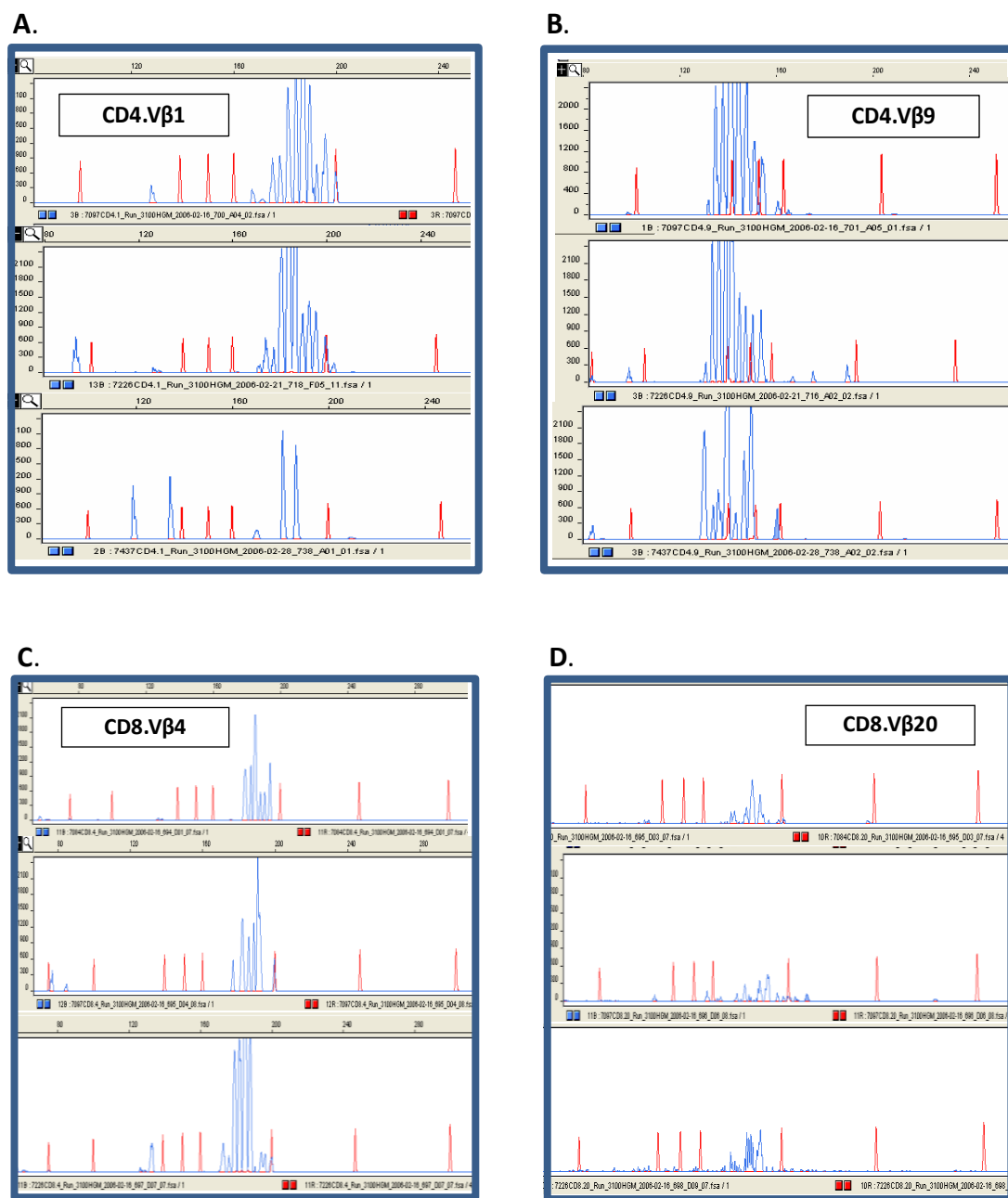
	<37 sem. (n=□□)				≥ 37 sem. (n=□□□)		
Semana gestacional	27	29	32	36	39	40	41
Nº.muestras	1	2	4	2	6	7	8

5.4.1.4.1. Variabilidad del TCR-V β dentro de la misma semana de gestación.

Para comparar a los neonatos nacidos en diferentes semanas gestacionales, primero se comprobó si los neonatos nacidos dentro de la misma semana de gestación presentaban un mismo repertorio de células T.

Cuando se compararon los clones de los 8 neonatos nacidos en semana 41, se observó que en las células T CD4⁺ las subfamilias V β 1, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 20, 22 y 23 mostraron idéntico patrón de expresión (*Figura 5.13.A,B*), mientras que en células T CD8⁺ sólo las subfamilias 4, 7, 17, 18, 20, 22, 23 y 24 tuvieron la misma clonalidad (*Figura 5.13.C,D*). Sin embargo, en células T CD8⁺, las subfamilias 6, 10, 14, 15, 16, 19 y 21 mostraron un patrón de clonalidad completamente distinto. En el resto de subfamilias, los neonatos nacidos en la semana 41 mostraron un patrón de expresión muy heterogéneo entre sí, tanto para células T CD4⁺ como para células T CD8⁺.

Figura 5.13. Comparación de la clonalidad del TCR-V β en 3 neonatos nacidos en semana 41 de gestación. Se representan, a modo de ejemplo, 2 subfamilias para células T CD4+, (A) V β 1 y (B) V β 9, y 2 subfamilias para células T CD8+, (C) V β 4 y (D) V β 20.



Al analizar los clones para los neonatos de semana 40 de gestación se observó el mismo patrón de expresión en las subfamilias 1, 2, 4, 5, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 22, 23 y 24 para células T CD4+, y en las subfamilias 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15,

16, 17, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 para células T CD8+. Sólo se observó un patrón diferente en la subfamilia 10 para células T CD8+, mientras que en el resto de subfamilias el patrón fue más variable para células T CD4+ y para células T CD8+ entre los neonatos estudiados. El mismo análisis se realizó en neonatos de semana 39 de gestación, observándose que en células T CD4+ las subfamilias 1, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 20, 22 y 23 tuvieron los mismos fragmentos, mientras que en células T CD8+ las subfamilias que tuvieron los mismos fragmentos fueron 3, 4, 5, 6, 9, 11, 17, 18, 19, 21, 22, 23 y 24. El resto de subfamilias mostraron un patrón más variable, excepto la subfamilia 15 en células T CD8+ que mostró una clonalidad totalmente distinta para cada uno de los recién nacidos estudiados.

Cuando se analizó la clonalidad de los neonatos del grupo < 37 semanas, se observó que los neonatos de semana 36 tuvieron la misma clonalidad para las subfamilias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23 y 24 para células T CD4+, mientras que en células T CD8+ las subfamilias con el mismo patrón de expresión fueron 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 13, 14, 16, 17, 22 y 23; las subfamilias 19 en CD4+, y 12 y 24 en CD8+ tuvieron una clonalidad distinta entre los niños de semana 36; el resto de subfamilias tuvieron un patrón de expresión más heterogéneo, tanto en células T CD4+ como en células T CD8+. Los neonatos de semana 32 tuvieron el mismo patrón de clonalidad para todas las subfamilias génicas en células T CD4+, excepto para la subfamilia 24 en la que la clonalidad fue distinta entre los 4 neonatos de esta semana de gestación; no fue posible realizar el estudio de la clonalidad de las subfamilias V β en células T CD8+ de neonatos de semana 32 por tener un bajo número de células de las que no fue posible extraer ARNm suficiente para el desarrollo de la técnica.

Los nacidos en la semana de gestación 29 tuvieron idéntico patrón de expresión en todas las subfamilias, excepto en las subfamilias 16 y 21 que tuvieron mayor variabilidad, para células T CD4+; además, el patrón fue idéntico en células T CD8+ para todas las subfamilias excepto para la 14, 21, 22 y 24, que también fueron más heterogéneas. El número de clones fue más alto en los neonatos nacidos en semana de gestación 29 que en los nacidos en las semanas *a término*. En cuanto al neonato de semana 27 de gestación, el patrón de clonalidad fue idéntico al de los neonatos de semana 29 de gestación en células T CD4+; respecto a las células T CD8+, el patrón en el recién nacido de la semana de gestación 27 fue igual para las subfamilias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 16, 22 y 23, la subfamilia 14 tuvo una clonalidad completamente distinta, y las subfamilias 12, 15, 17, 18, 19, 20, 21 y 24 tuvieron un patrón similar de expresión, aunque el número de clones fue menor.

5.4.1.4.2. Variabilidad del TCR-V β entre distintas semanas de gestación.

Al comparar la clonalidad entre semanas de gestación, se clasificaron de forma muy preliminar en tres patrones de expresión distintos:

1. Patrón de NO CAMBIOS: la clonalidad de algunas subfamilias se mantuvo invariable entre semanas de gestación: o bien por POLICLONALIDAD, es decir, existió un número elevado de clones y se mantuvo así en todas las semanas de gestación; o bien por NO CLONALIDAD, o la no presencia de clones en ninguna semana de gestación. En células T CD4+ las subfamilias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 17 mantuvieron un número alto de clones en todas las semanas de gestación estudiadas. Sin embargo, las subfamilias 22 y 23 no se expresaron en ninguno de los neonatos.

2. Patrón de REGRESIÓN: de un número de clones elevado en las semanas más tempranas, se pasó a un número menor de clones en las semanas 39, 40 y 41. Cuando se compararon los neonatos de <37 semanas con los niños de ≥ 37 semanas, se observó este patrón en las subfamilias 15, 16, 21 y 24, en células T CD4+.
3. Patrón de PROGRESIÓN: de un número limitado de clones en las semanas más prematuras, se pasó a un número mayor de clones en las últimas semanas de la gestación. De la semana 32 a la semana 41, las subfamilias que aumentaron el número de clones en células T CD4+ fueron: 2, 3, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 16, 24.

5.4.1.5. Análisis de subpoblaciones T inmaduras y virgen.

Para describir las nuevas subpoblaciones de células T que salen del timo, se realizó el análisis de las subpoblaciones de células T inmaduras y T virgen en 125 de los 183 neonatos incluidos en el estudio, por citometría de flujo en sangre de cordón umbilical. Se determinó la variación de cada subpoblación a lo largo del periodo gestacional estudiado por semanas de gestación (*semana a semana*) (Tabla 5.11) y por grupos gestacionales (*muy pretérmino, pretérmino y a término*).

Tabla 5.11. Número de muestras por semanas de gestación que se incluyeron en el análisis de subpoblaciones linfocitarias T (inmaduras y virgen).

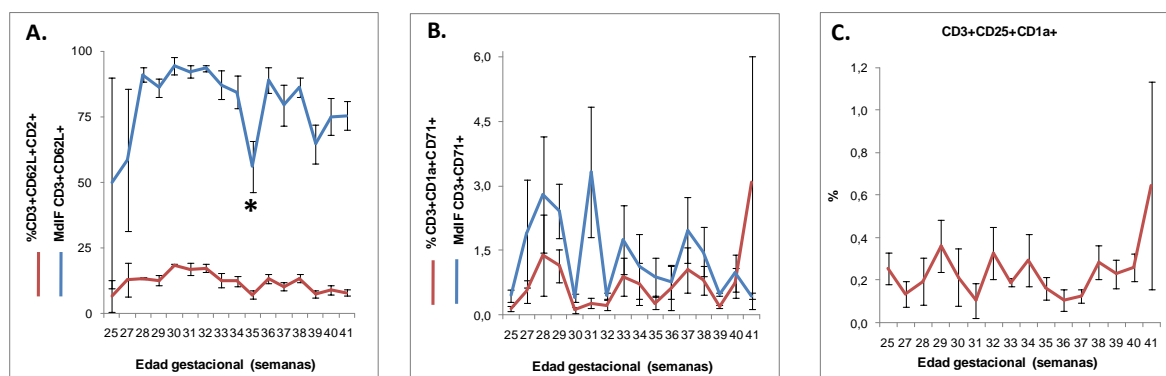
EG	25	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
n	2	3	3	11	2	3	6	6	6	11	10	9	11	14	9	18	1

EG: edad gestacional (semanas), n: n° neonatos por cada semana de gestación.

Los grupos gestacionales fueron: *muy pretérmino* (≤ 30 semanas), $n=21$; *pretérmino* (31-36 semanas), $n=42$; *a término* (≥ 37 semanas), $n=62$.

En el análisis *semana a semana*, se encontró que las células T inmaduras con capacidad de migrar a ganglio (%CD3+CD62L+CD2+, MdIF CD3+CD62L+) (Figura 5.14.A) presentaron valores similares e irregulares a lo largo del periodo estudiado. Esta tendencia también se observó en las células T activadas con fenotipo inmaduro (%CD3+CD1a+CD71+, MdIF CD3+CD71+, %CD3+CD25+CD1a+) (Figura 5.14.B,C).

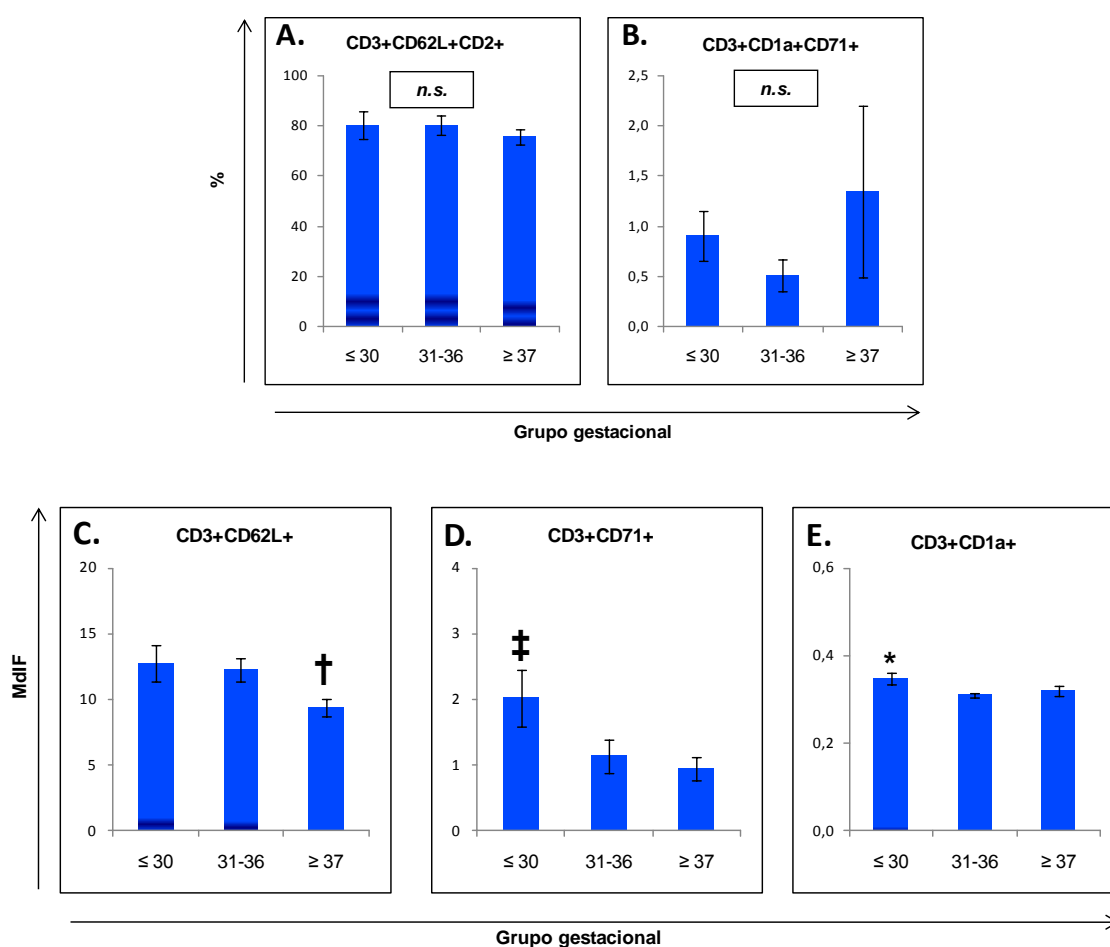
Figura 5.14. Subpoblaciones linfocitarias T *semana a semana*. (A) Células T inmaduras con capacidad de migrar a ganglio. Se representa el porcentaje de células y el número de moléculas de CD62L+ que expresa cada célula (MdIF). (*) Diferencias significativas de la semana 35 con el resto de semanas de gestación ($p<0,05$) (B) Timocitos corticales (células muy inmaduras) activados. Se representa el porcentaje de células activadas y el número de moléculas de activación (como células CD3+CD71+) que expresa cada célula (MdIF). C) Porcentaje de células T activadas (CD25+).



En el análisis por grupos gestacionales (*muy pretérmino*, *pretérmino* y *a término*) no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células T CD3+ inmaduras entre los tres grupos de neonatos (Figura 5.15.A,B). Sin embargo, se observó un número significativamente mayor de marcadores celulares de inmadurez (CD62L, CD1a, CD71) expresado como mediana de intensidad de fluorescencia (MdIF), en el

grupo *muy pretérmino* respecto a los otros dos grupos gestacionales estudiados (*Figura 5.15.C,D,E*).

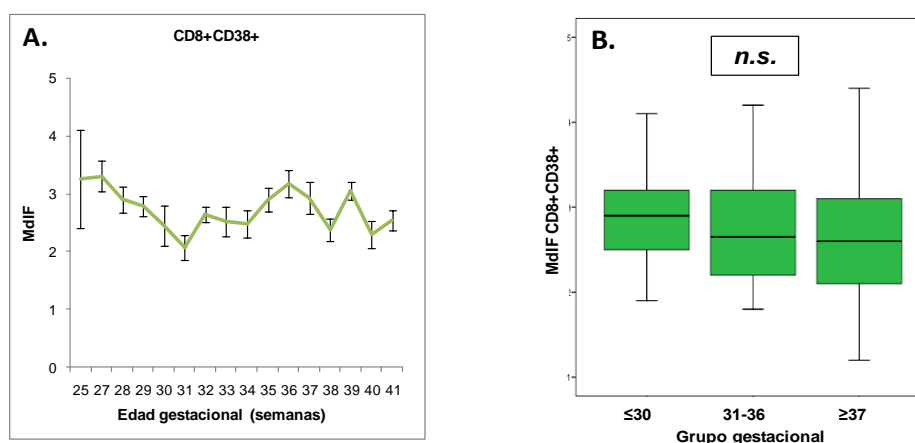
Figura 5.15. Células T CD3+ inmaduras analizadas por grupos gestacionales (≤ 30 semanas o *muy pretérmino*, 31-36 sem. o *pretérmino* y ≥ 37 sem. o *a término*). (A) Timocitos con capacidad de migrar a ganglio (porcentajes). (B) Timocitos corticales (células muy inmaduras) (porcentajes). (C, D, E) Cantidad de marcadores celulares de inmadurez (MdIF). (n.s.), no significación estadística. (†), ≥ 37 vs. ≤ 30 ($p=0,023$), ≥ 37 vs. 31-36 ($p=0,011$). (‡), ≤ 30 vs. 31-36 ($p=0,001$), ≤ 30 vs. ≥ 37 ($p<0,001$). (*), ≤ 30 vs. 31-36 ($p=0,002$), ≤ 30 vs. ≥ 37 ($p<0,001$).



Las células T CD8 inmaduras (MdIF CD8+CD38+) (*Figura 5.16.A*), también presentaron valores irregulares a lo largo del periodo estudiado y similares a los valores de células T inmaduras. Al analizar la subpoblación de células inmaduras T

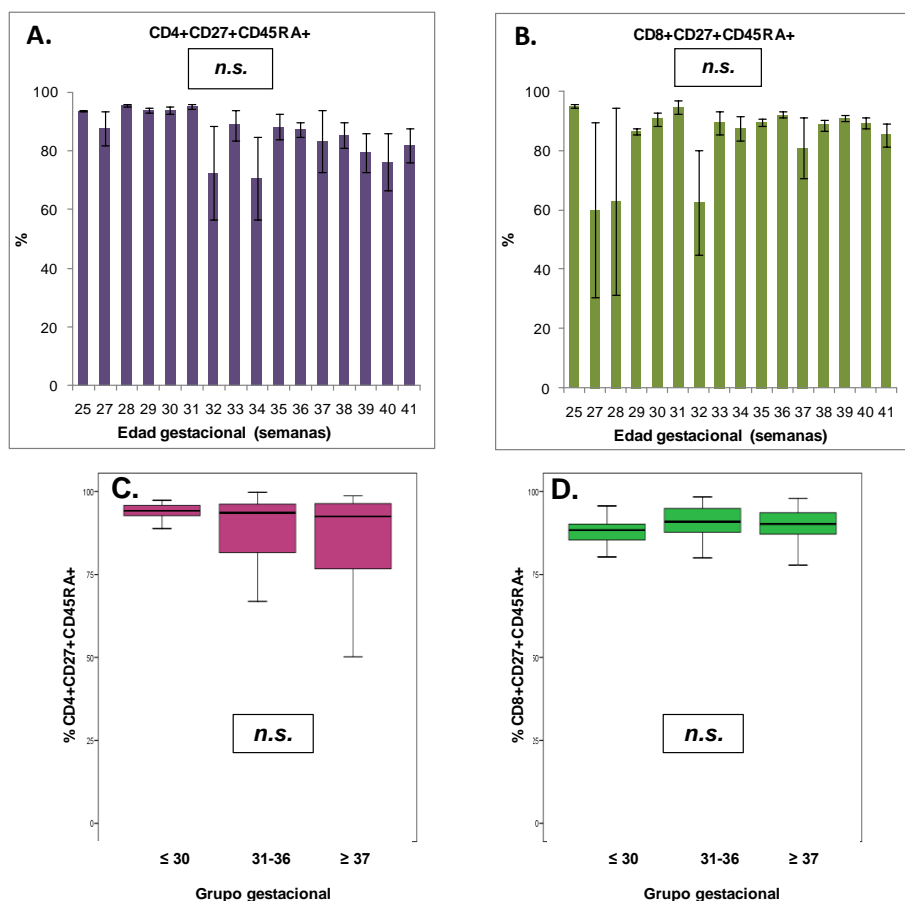
CD8+CD38+ por grupos gestacionales, se observó que no existían diferencias significativas entre ninguno de los tres grupos gestacionales estudiados (*Figura 5.16.B*).

Figura 5.16. Células T CD8+ inmaduras, analizadas por la expresión del marcador CD38, (**A**) *semana a semana*, donde se observaron valores muy heterogéneos a lo largo de todo el periodo gestacional estudiado y (**B**) por grupos gestacionales (≤ 30 semanas o *muy pretérmino*, 31-36 *sem. o pretérmino* y ≥ 37 *sem. o a término*), no encontrándose diferencias significativas entre ninguno de los tres grupos de neonatos. (**n.s.**), no significación estadística.



En cuanto a subpoblaciones de células T CD4+ y T CD8+ no se observaron diferencias significativas en las células T CD4 virgen (%CD4+CD27+CD45RA+) y células T CD8+ virgen (%CD8+CD27+CD45RA+), en el análisis *semana a semana* (*Figura 5.17.A,B*) y entre los tres grupos gestacionales estudiados (*Figura 5.17.C,D*).

Figura 5.17. Análisis de las células T CD4+ y T CD8+ virgen (CD27+CD45RA+), semana a semana de gestación (**A, B**) y por grupos gestacionales (≤ 30 semanas o muy pretérmino, 31-36 sem. o pretérmino y ≥ 37 sem. o a término) (**C, D**). No se encontraron diferencias significativas, ni entre semanas de gestación ni entre grupos gestacionales. (**n.s.**), no significación estadística.



Se determinaron los porcentajes de las subpoblaciones de células T CD3+ inmaduras (Tabla 5.12) y las subpoblaciones de células virgen T CD4+ y T CD8+ (Tabla 5.13), semana a semana de gestación y por grupos gestacionales (muy pretérmino, pretérmino y a término).

Tabla 5.12. Valores de referencia en porcentajes de las subpoblaciones de células T CD3+ inmaduras.

Edad gestacional (semanas)	N	CD3+CD62L+CD2+		CD3+CD1a+CD71+		CD3+CD25+CD1a+	
		Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)
25	2	49,8	(9,5 ; 90,0)	0,15	(0,09 ; 0,20)	0,26	(0,18 ; 0,33)
27	3	82,2	(4,5 ; 89,0)	0,62	(0,04 ; 0,97)	0,11	(0,05 ; 0,25)
28	3	90,4	(86,4 ; 96,2)	0,92	(0,03 ; 3,23)	0,11	(0,06 ; 0,42)
29	11	91,6	(77,7 ; 95,5)	0,41	(0,10 ; 1,97)	0,19	(0,15 ; 0,29)
30	2	94,4	(91,2 ; 97,7)	0,12	(0,05 ; 0,18)	0,22	(0,08 ; 0,35)
31	3	93,1	(87,9 ; 95,7)	0,37	(0,03 ; 0,43)	0,04	(0,01 ; 0,27)
32	6	94,6	(90,5 ; 96,0)	0,14	(0,06 ; 0,34)	0,26	(0,07 ; 0,63)
33	6	92,9	(80,3 ; 94,9)	0,29	(0,16 ; 2,12)	0,20	(0,15 ; 0,22)
34	6	91,2	(77,5 ; 92,5)	0,27	(0,17 ; 1,04)	0,18	(0,12 ; 0,48)
35	11	64,6	(25,7 ; 88,6)	0,12	(0,07 ; 0,25)	0,09	(0,03 ; 0,30)
36	10	95,0	(89,9 ; 96,1)	0,12	(0,05 ; 0,17)	0,08	(0,02 ; 0,12)
37	9	92,1	(61,2 ; 94,8)	0,11	(0,03 ; 2,51)	0,14	(0,02 ; 0,19)
38	11	89,8	(82,5 ; 94,6)	0,21	(0,08 ; 2,13)	0,22	(0,14 ; 0,34)
39	14	71,5	(45,0 ; 87,4)	0,17	(0,07 ; 0,28)	0,12	(0,05 ; 0,37)
40	9	84,3	(56,3 ; 94,3)	0,22	(0,13 ; 1,45)	0,30	(0,07 ; 0,40)
41	18	84,7	(62,6 ; 91,4)	0,12	(0,04 ; 0,19)	0,12	(0,05 ; 0,27)
Grupo gestacional	N	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)
≤ 30	21	90,0	(79,3 ; 95,2)	0,33	(0,01 ; 1,4)	0,19	(0,11 ; 0,31)
31-36	42	91,3	(77,6 ; 95,0)	0,16	(0,01 ; 0,3)	0,12	(0,06 ; 0,26)
≥ 37	62	86,7	(60,1 ; 94,1)	0,17	(0,1 ; 0,3)	0,16	(0,06 ; 0,30)

Se describen los valores en Mediana (percentil 25 ; percentil 75), excepto para las semanas 25, 27, 28, 30 y 31, en las que se expresan en Mediana (mínimo ; máximo). Se han resaltado en negrita los valores con diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al resto de semanas de gestación.

Tabla 5.13. Valores de referencia (porcentajes) de subpoblaciones virgen de células T CD4+ y T CD8+.

Edad gestacional (semanas)	N	CD4+CD27+CD45RA+		CD8+CD27+CD45RA+	
		Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)
25	2	93,8	(93,4 ; 94,2)	95,0	(94,4 ; 95,7)
27	3	92,6	(76,5 ; 94,6)	89,0	(0,9 ; 90,2)
28	3	95,8	(95,0 ; 96,5)	90,1	(0 ; 98,7)
29	11	93,7	(92,0 ; 96,2)	86,9	(84,8 ; 89,3)
30	2	94,1	(92,9 ; 95,3)	90,8	(88,6 ; 92,9)
31	3	96,1	(93,6 ; 96,4)	96,6	(90,4 ; 97,4)
32	6	94,8	(38,0 ; 96,7)	87,7	(10,4 ; 91,9)
33	6	92,8	(77,9 ; 99,7)	93,2	(78,8 ; 97,7)
34	6	77,0	(54,8 ; 96,6)	91,5	(83,1 ; 93,4)
35	11	94,4	(91,8 ; 95,0)	89,6	(84,9 ; 93,5)
36	10	86,0	(83,0 ; 95,6)	92,5	(89,2 ; 96,0)
37	9	95,6	(86,2 ; 97,1)	90,9	(87,4 ; 92,6)
38	11	90,8	(75,6 ; 96,4)	88,7	(86,9 ; 92,4)
39	14	94,4	(46,0 ; 96,2)	90,7	(87,8 ; 94,7)
40	9	91,5	(55,6 ; 93,9)	88,6	(87,3 ; 93,4)
41	18	90,6	(77,4 ; 97,0)	89,5	(83,6 ; 93,9)
Grupo gestacional	N	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)
≤ 30	21	94,2	(92,7 ; 95,9)	88,6	(85,4 ; 91,2)
31-36	42	93,6	(80,8 ; 96,3)	90,8	(87,6 ; 95,0)
≥ 37	62	92,5	(76,4 ; 96,4)	90,2	(87,1 ; 93,7)

Se describen los valores en Mediana (percentil 25 ; percentil 75), excepto para las semanas 25, 27, 28, 30 y 31 en las que se expresan en Mediana (mínimo ; máximo). No se encontraron diferencias significativas.

5.4.2. SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS T DE MEMORIA.

El análisis de subpoblaciones de células T memoria se realizó por citometría de flujo en sangre total en 125 de los 183 neonatos incluidos en el estudio. Se determinó la variación de cada subpoblación a lo largo del periodo gestacional estudiado, tanto por semanas de gestación (*semana a semana*) (Tabla 5.14) como por grupos gestacionales (*muy pretérmino, pretérmino y a término*).

Tabla 5.14. Número de muestras por semanas de gestación que se incluyeron en el análisis de subpoblaciones de células T memoria.

EG	25	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
n	2	3	3	11	2	3	6	6	6	11	10	9	11	14	9	18	1

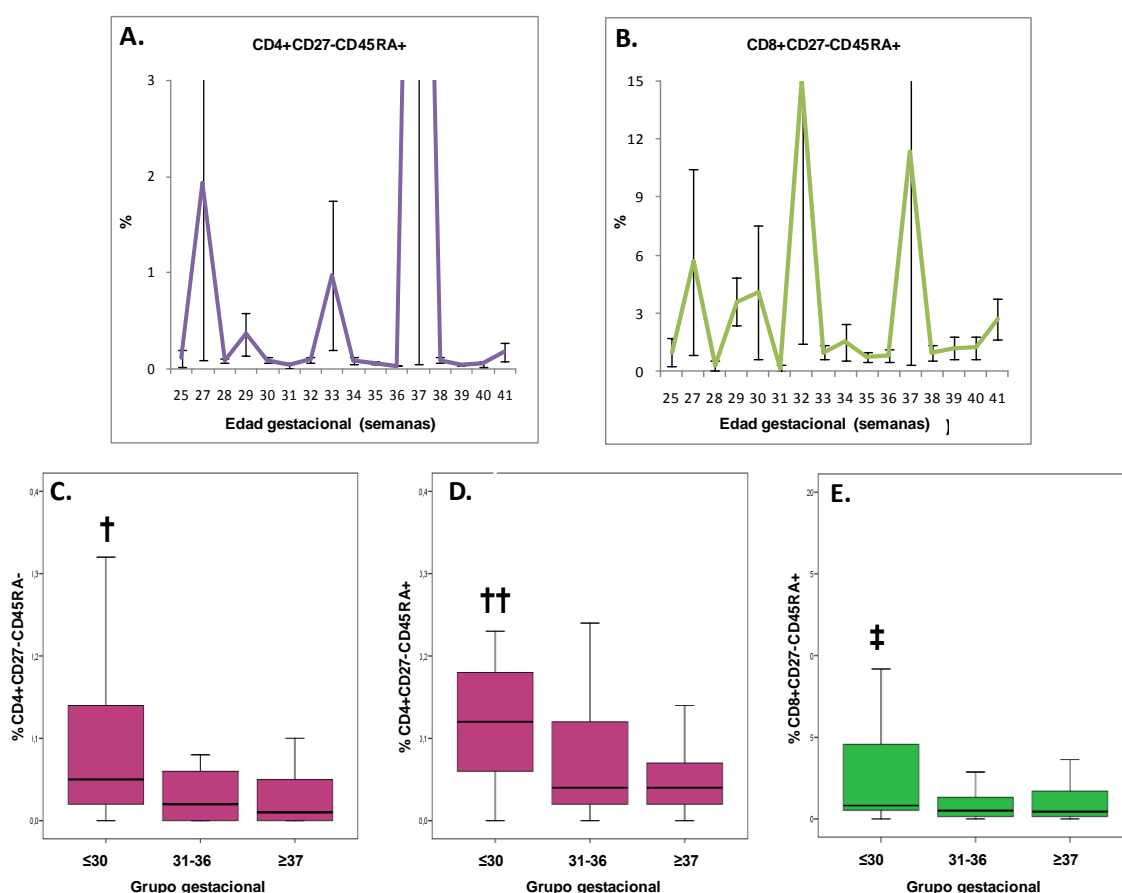
EG: edad gestacional, n: nº neonatos por cada semana de gestación.

Los grupos gestacionales fueron: *muy pretérmino* (≤ 30 semanas), n=21; *pretérmino* (31-36 semanas), n=42; *a término* (≥ 37 semanas), n=62.

En la población de células T CD4⁺ efectoras (%CD4⁺CD27⁺CD45RA⁺) se encontraron valores significativamente más altos en las semanas 29 y 33 (Figura 5.18.A). Sin embargo, en la población de células T CD8⁺ efectoras (CD8⁺CD27⁺CD45RA⁺) sólo se observaron valores significativamente más altos en la semana 29 (Figura 5.18.B). Estas diferencias fueron similares a las observadas cuando se realizó el análisis por grupos gestacionales estudiados, ya que se observaron mayores porcentajes de células T CD4⁺ pre-efectoras (CD4⁺CD27⁺CD45RA⁻) (Figura 5.18.C) y mayores porcentajes de células efectoras (CD27⁺CD45RA⁺), en células T CD4⁺ (Figura 5.18.D)

y en células T CD8+ (*Figura 5.18.E*) en el grupo *muy pretérmino*, en comparación con los otros dos grupos de neonatos.

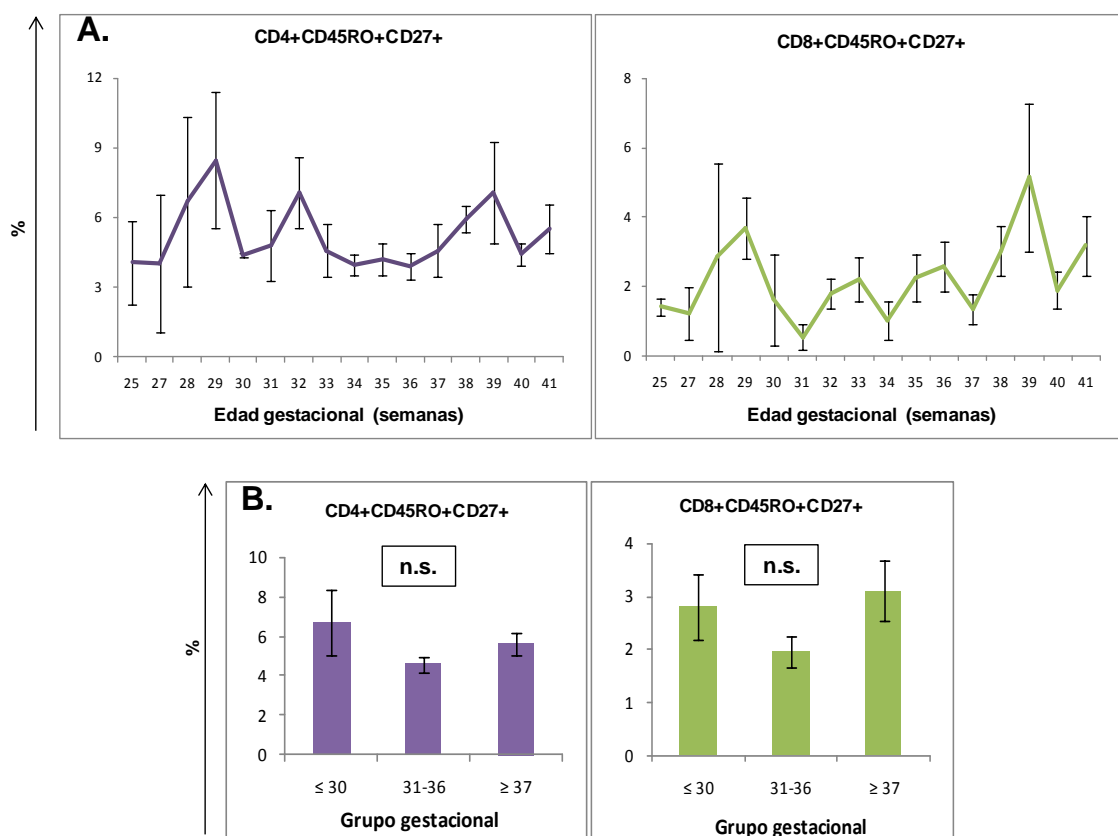
Figura 5.18. Subpoblaciones de células efectoras (CD27-CD45RA+) por semanas de gestación, (A) células T CD4+ y (B) T CD8+. Por grupos gestacionales (≤ 30 semanas o *muy pretérmino*, 31-36 sem. o *pretérmino* y ≥ 37 sem. o *a término*), (C) Células T CD4+ preelectoras, (D) T CD4+ efectoras, (E) Células T CD8+ efectoras. (†), ≤ 30 vs. 31-36 ($p=0,024$), ≤ 30 vs. ≥ 37 ($p=0,004$). (††), ≤ 30 vs. 31-36 ($p=0,010$), ≤ 30 vs. ≥ 37 ($p=0,001$). (‡), ≤ 30 vs. 31-36 ($p=0,047$).



Cuando se analizó la subpoblación de memoria central (CD45RO+CD27+) por semanas de gestación (semana 25 a 41 de gestación), se observó en células T CD4+ un valor significativamente más alto en la semana 38 que en el resto de semanas de gestación. Sin embargo, en células T CD8+ no se encontraron diferencias significativas entre ninguna de las semanas de gestación estudiadas (*Figura 5.19.A*). Además, al

realizar el análisis por grupos gestacionales (*muy pretérmino*, *pretérmino* y *a término*) no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos estudiados, ni en células T CD4+ ni en células T CD8+ (*Figura 5.19.B*).

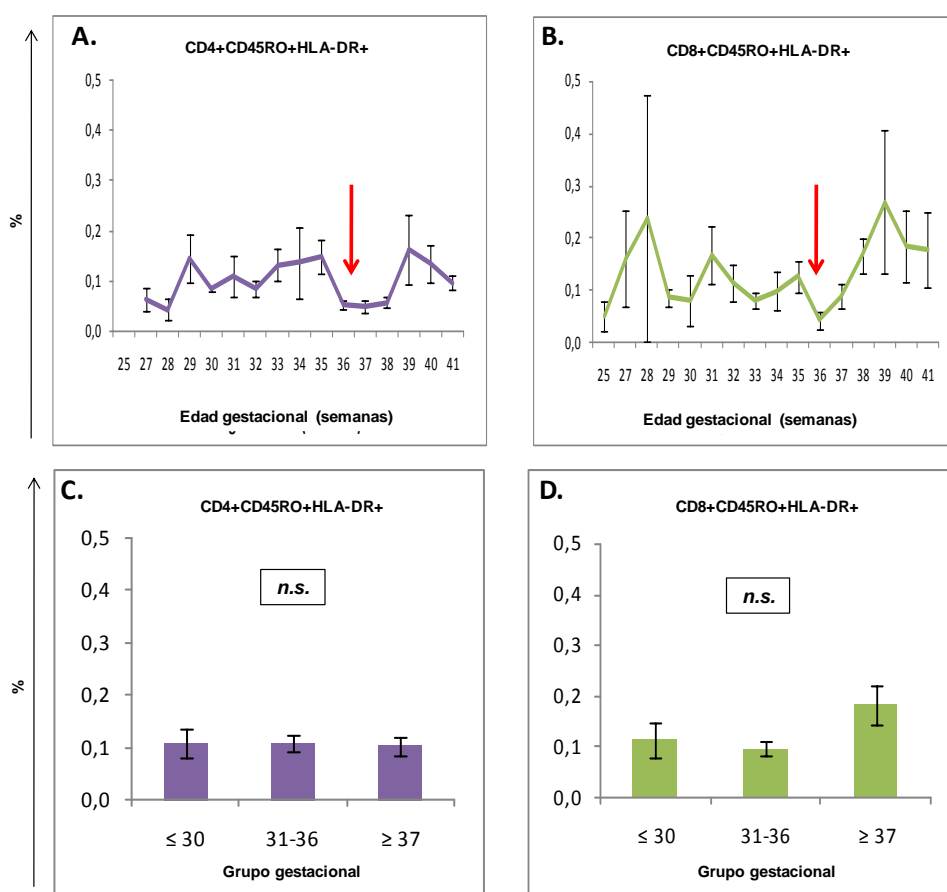
Figura 5.19. Subpoblaciones de células de memoria central (CD45RO+CD27+) T CD4+ y T CD8+ por semanas de gestación (**A**) y por grupos gestacionales (≤ 30 semanas o *muy pretérmino*, 31-36 *sem.* o *pretérmino* y ≥ 37 *sem.* o *a término*) (**B**). (n.s.), no significación estadística.



Al analizar las subpoblaciones de células T de memoria activadas (CD45RO+HLA-DR+) T CD4+ y T CD8+ se observó que durante las semanas *pretérmino* el porcentaje se mantenía constante, hasta llegar a la semana 36 en donde se produjo un descenso significativo, para volver a aumentar paulatinamente a lo largo de las semanas *a término* (*Figura 5.20.A,B*). En el análisis por grupos gestacionales no se

observaron diferencias significativas en estas subpoblaciones de células T entre ninguno de los 3 grupos estudiados (*muy pretérmino, pretérmino y a término*) (Figura 5.20.C,D).

Figura 5.20. Subpoblaciones de células memoria activadas de T CD4+ (A) y T CD8+ (B), evaluadas por semanas de gestación. Se observa un mantenimiento de los porcentajes a lo largo de todo el periodo *pretérmino*, para disminuir en la semana 36 de gestación. Después se da un aumento paulatino, alcanzando niveles máximos en la semana 39. Por grupos gestacionales (≤ 30 semanas o *muy pretérmino*, 31-36 sem. o *pretérmino* y ≥ 37 sem. o *a término*) no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los tres grupos, ni en células T CD4+ (C) ni en células T CD8+ (D).



Se analizaron los valores de referencia en porcentajes de las subpoblaciones de memoria de células T CD4+ (Tabla 5.15.A) y T CD8+ (Tabla 5.15.B), semana a semana de gestación y por grupos gestacionales (*muy pretérmino, pretérmino y a término*).

Tabla 5.15. Porcentajes de las subpoblaciones de células memoria y memoria activadas T CD4+ (A) y T CD8+ (B), por semanas de gestación y por grupos gestacionales.

A.

Edad gestacional (semanas)	N	CD4+CD27-CD45RA-		CD4+CD27-CD45RA+		CD4+CD45RO+CD27+		CD4+CD45RO+HLA-DR+	
		Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)
25	2	0,32	(0,09 ; 0,55)	0,11	(0,02 ; 0,20)	4,07	(2,28 ; 5,86)	.	.
27	3	0,14	(0 ; 0,16)	0,18	(0 ; 5,64)	2,22	(0,04 ; 9,78)	0,04	(0,04 ; 0,04)
28	3	0,03	(0,02 ; 0,10)	0,08	(0,05 ; 0,13)	4,09	(2,15 ; 13,90)	0,04	(0,04 ; 0,04)
29	11	0,03	(0,01 ; 0,31)	0,14	(0,07 ; 0,23)	6,38	(3,51 ; 8,97)	0,07	(0,04 ; 0,27)
30	2	0,04	(0,03 ; 0,05)	0,09	(0,06 ; 0,12)	4,40	(4,28 ; 4,51)	0,09	(0,01 ; 0,09)
31	3	0,02	(0,01 ; 0,02)	0,01	(0 ; 0,10)	3,46	(3,15 ; 7,84)	0,13	(0,07 ; 0,13)
32	6	0,07	(0,03 ; 0,15)	0,12	(0,02 ; 0,14)	6,52	(4,80 ; 9,47)	0,09	(0,04 ; 0,12)
33	6	0,01	(0 ; 0,04)	0,23	(0,07 ; 1,52)	4,74	(2,50 ; 7,23)	0,15	(0,04 ; 0,20)
34	6	0,03	(0,02 ; 0,09)	0,04	(0,01 ; 0,20)	4,00	(3,10 ; 4,99)	0,08	(0,04 ; 0,22)
35	11	0,04	(0 ; 0,06)	0,03	(0,02 ; 0,10)	3,56	(2,10 ; 6,84)	0,15	(0,08 ; 0,18)
36	10	0,02	(0 ; 0,02)	0,03	(0,02 ; 0,05)	3,80	(2,39 ; 4,53)	0,05	(0,03 ; 0,07)
37	9	0,01	(0 ; 0,07)	0,06	(0,01 ; 0,11)	3,65	(2,19 ; 7,68)	0,04	(0,03 ; 0,06)
38	11	0,03	(0,01 ; 0,05)	0,05	(0,03 ; 0,12)	5,78	(5,10 ; 6,75)	0,06	(0,03 ; 0,10)
39	14	0,00	(0 ; 0,01)	0,03	(0,01 ; 0,06)	4,26	(2,28 ; 7,00)	0,09	(0,05 ; 0,15)
40	9	0,03	(0 ; 0,06)	0,02	(0,01 ; 0,06)	4,55	(3,40 ; 5,48)	0,13	(0,03 ; 0,23)
41	18	0,02	(0 ; 0,06)	0,05	(0,03 ; 0,13)	4,54	(2,43 ; 7,21)	0,09	(0,06 ; 0,13)
Grupo gestacional	N	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)
≤ 30	21	0,05	(0,02 ; 0,15)	0,12	(0,06 ; 0,19)	4,51	(2,32 ; 8,51)	0,08	(0,04 ; 0,11)
31-36	42	0,02	(0 ; 0,06)	0,04	(0,02 ; 0,12)	4,10	(2,91 ; 6,51)	0,08	(0,04 ; 0,15)
≥ 37	62	0,01	(0 ; 0,05)	0,04	(0,02 ; 0,07)	4,67	(2,64 ; 6,50)	0,07	(0,04 ; 0,13)

B.

Edad gestacional (semanas)	N	CD8+CD27-CD45RA+		CD8+CD45RO+CD27+		CD8+CD45RO+HLA-DR+		CD8+CD45RO+CD38+	
		Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)
25	2	1,00	(0,28 ; 1,72)	1,41	(1,15 ; 1,66)	0,05	(0,02 ; 0,08)	0,31	(0,08 ; 0,53)
27	3	1,29	(0,42 ; 15,33)	0,69	(0,23 ; 2,74)	0,16	(0 ; 0,32)	0,16	(0,03 ; 1,18)
28	3	0,17	(0 ; 0,82)	0,25	(0 ; 8,26)	0,00	(0 ; 0,71)	0,44	(0,20 ; 3,64)
29	11	1,94	(0,61 ; 4,90)	2,85	(1,07 ; 6,71)	0,09	(0,03 ; 0,11)	0,64	(0,09 ; 2,73)
30	2	4,13	0,66	1,62	(0,30 ; 2,93)	0,08	(0,03 ; 0,13)	0,79	(0,10 ; 1,48)
31	3	0,04	(0,03 ; 0,58)	0,17	(0,16 ; 1,25)	0,15	(0,08 ; 0,27)	0,13	(0,06 ; 0,22)
32	6	1,21	(0,21 ; 24,17)	1,65	(0,87 ; 2,90)	0,14	(0,02 ; 0,18)	0,59	(0,45 ; 0,89)
33	6	0,76	(0,29 ; 1,79)	2,18	(0,84 ; 3,11)	0,07	(0,06 ; 0,11)	0,49	(0,17 ; 1,74)
34	6	0,77	(0,20 ; 2,51)	0,62	(0,17 ; 1,55)	0,11	(0 ; 0,17)	0,21	(0,07 ; 0,48)
35	11	0,37	(0,10 ; 1,01)	1,93	(0,30 ; 3,20)	0,12	(0,03 ; 0,24)	0,20	(0,09 ; 1,44)
36	10	0,37	(0,13 ; 1,68)	1,98	(0,43 ; 4,32)	0,02	(0 ; 0,09)	0,53	(0,33 ; 1,58)
37	9	0,35	(0,11 ; 0,68)	0,78	(0,33 ; 2,27)	0,08	(0,01 ; 0,17)	0,22	(0,08 ; 1,16)
38	11	0,33	(0,07 ; 1,39)	2,74	(0,93 ; 4,22)	0,17	(0,05 ; 0,25)	0,46	(0,17 ; 2,16)
39	14	0,37	(0,16 ; 1,52)	3,16	(0,24 ; 5,52)	0,11	(0,03 ; 0,20)	0,29	(0,15 ; 1,73)
40	9	0,48	(0,21 ; 2,06)	2,00	(0,54 ; 2,73)	0,12	(0,05 ; 0,28)	0,69	(0,08 ; 1,54)
41	18	1,64	(0,19 ; 3,40)	2,03	(0,48 ; 4,26)	0,08	(0,03 ; 0,16)	0,34	(0,10 ; 1,45)
Grupo gestacional	N	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)
≤ 30	21	0,82	(0,48 ; 4,74)	1,66	(0,50 ; 5,12)	0,08	(0,03 ; 0,15)	0,44	(0,10 ; 1,66)
31-36	42	0,51	(0,15 ; 1,35)	1,18	(0,43 ; 3,10)	0,08	(0,02 ; 0,15)	0,42	(0,14 ; 0,72)
≥ 37	62	0,45	(0,14 ; 1,70)	2,03	(0,56 ; 3,97)	0,10	(0,04 ; 0,18)	0,40	(0,14 ; 1,34)

Se describen los valores en Mediana (percentil 25 ; percentil 75), excepto para las semanas 25, 27, 28, 30 y 31 en las que se expresan en Mediana (mínimo ; máximo). Se han resaltado en negrita los valores con diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al resto de semanas de gestación.

5.5. CÉLULAS NK.

Se analizaron las subpoblaciones de células NK que expresaban marcadores de superficie específicos frente a virus (KIR-NKAT2 y KIRP70) por citometría de flujo en sangre total de cordón umbilical en 125 de los 183 neonatos incluidos en el estudio. Se estudió la variación de las dos subpoblaciones por semanas de gestación (*semana a semana*) (Tabla 5.16) y por grupos gestacionales (*muy pretérmino*, *pretérmino* y *a término*).

Tabla 5.16. Distribución de muestras en las que se realizó el análisis de subpoblaciones de células NK, por semanas de gestación.

EG	25	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
n	2	3	3	11	2	3	6	6	6	11	10	9	11	14	9	18	1

EG: edad gestacional (semanas), n: n° neonatos por cada semana de gestación.

Los grupos gestacionales fueron: *muy pretérmino* (≤ 30 semanas), n=21; *pretérmino* (31-36 semanas), n=42; *a término* (≥ 37 semanas), n=62.

En el análisis *semana a semana*, se observó que el número de células NK que expresaban KIR-NKAT2+ y KIRP70+ se incrementó conforme aumentó la edad gestacional, con diferencias significativas en varias semanas del periodo *a término* (38, 40 y 41) respecto de varias semanas del periodo *pretérmino* (Figura 5.21.A,B). Sin embargo, cuando se hizo el análisis por grupo de edad gestacional (*muy pretérmino*, *pretérmino* y *a término*), sólo se encontraron diferencias significativas en las células NK que expresaban KIR-NKAT2+, cuyos valores fueron significativamente más altos en el grupo *a término* (≥ 37), respecto a los otros 2 grupos analizados (Figura 5.21.C).

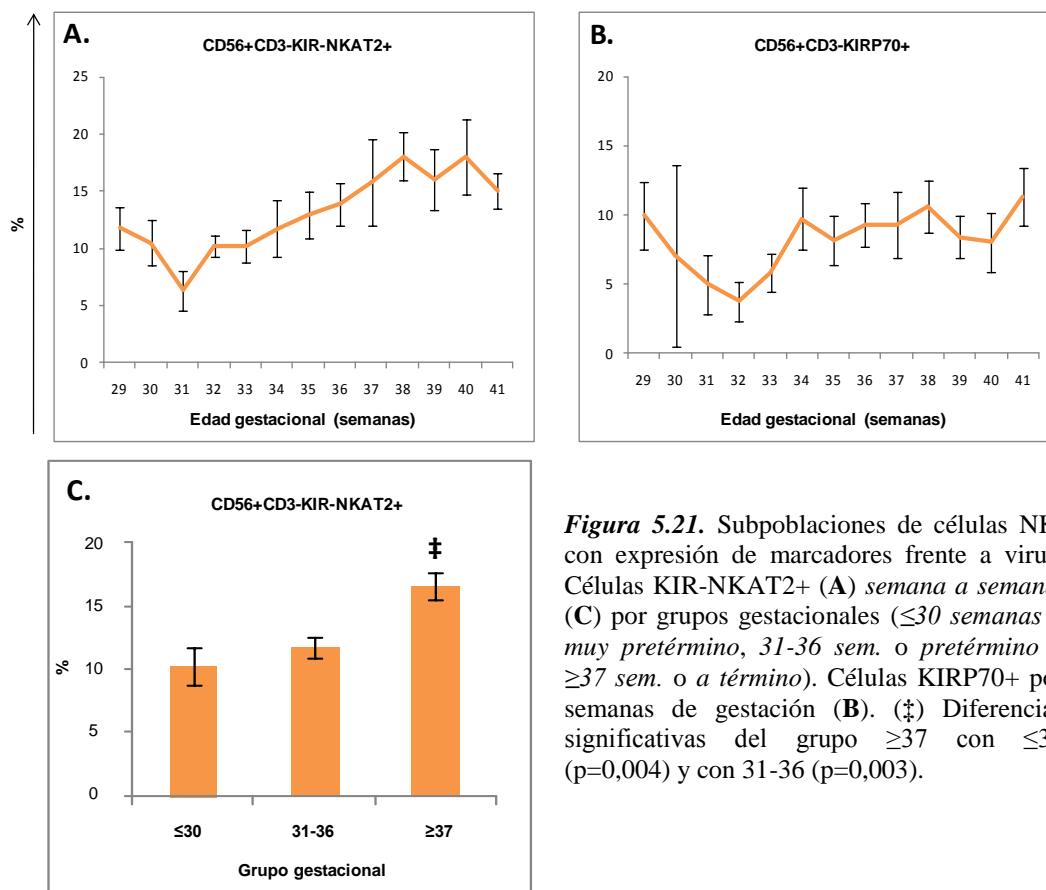


Figura 5.21. Subpoblaciones de células NK, con expresión de marcadores frente a virus. Células KIR-NKAT2+ (**A**) semana a semana, (**C**) por grupos gestacionales (≤ 30 semanas o muy pretérmino, 31-36 sem. o pretérmino y ≥ 37 sem. o a término). Células KIRP70+ por semanas de gestación (**B**). (‡) Diferencias significativas del grupo ≥ 37 con ≤ 30 ($p=0,004$) y con 31-36 ($p=0,003$).

Se determinaron los porcentajes de las subpoblaciones de células NK (Tabla 5.17) semana a semana de gestación y por grupos gestacionales (muy pretérmino, pretérmino y a término).

Tabla 5.17. Valores de referencia en porcentajes de las subpoblaciones de células NK que expresan marcadores celulares frente a virus (KIRs).

Edad gestacional (semanas)	N	CD56+CD3-KIR-NKAT2+		CD56+CD3-KIRP70+	
		Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)
25	2	10,6	(0 ; 21,2)	12,9	(0 ; 25,8)
27	3	9,2	(1,6 ; 13,4)	5,2	(0,2 ; 100,0)
28	3	7,4	(0 ; 11,6)	6,4	(0 ; 10,6)
29	11	9,3	(7,6 ; 16,2)	9,7	(3,1 ; 14,7)
30	2	10,5	(8,6 ; 12,5)	7,0	(0,5 ; 13,6)
31	3	7,5	(2,9 ; 8,5)	5,2	(1,2 ; 8,7)
32	6	9,8	(8,2 ; 12,3)	2,9	(0,6 ; 7,2)
33	6	9,2	(7,6 ; 13,5)	4,7	(3,3 ; 9,7)
34	6	11,5	(7,7 ; 16,2)	10,8	(6,2 ; 13,9)
35	11	10,7	(8,2 ; 16,8)	6,6	(4,4 ; 12,0)
36	10	14,0	(9,1 ; 19,5)	9,3	(6,3 ; 11,8)
37	9	12,8	(6,2 ; 25,3)	8,4	(2,6 ; 15,5)
38	11	19,6	(11,3 ; 21,4)	10,5	(6,1 ; 13,8)
39	14	15,5	(8,0 ; 23,7)	7,7	(3,9 ; 14,3)
40	9	14,4	(12,1 ; 20,8)	8,1	(1,2 ; 13,9)
41	18	13,9	(9,9 ; 21,8)	9,1	(5,7 ; 15,8)
Grupo gestacional	N	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)
≤ 30	21	9,2	(6,5 ; 14,8)	7,1	(0,9 ; 14,1)
31-36	42	9,8	(8,1 ; 14,7)	6,9	(3,8 ; 10,4)
≥ 37	62	14,9	(9,9 ; 21,6)	8,2	(4,2 ; 15,1)

Se describen los valores en Mediana (percentil 25 ; percentil 75), excepto para las semanas 25, 27, 28, 30 y 31 en las que se expresan en Mediana (mínimo ; máximo). Se han resaltado en negrita los valores con diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al resto de semanas de gestación.

5.6. CÉLULAS DENDRÍTICAS.

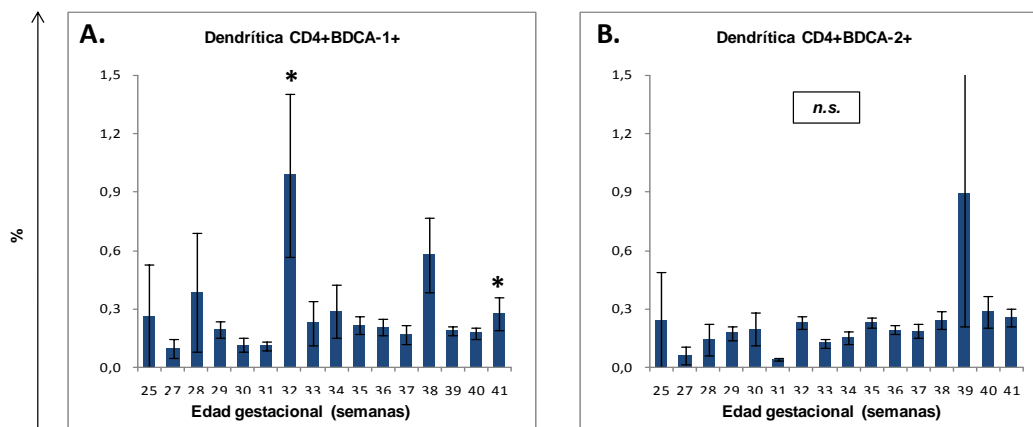
Se realizó un análisis por citometría de flujo de las subpoblaciones de células dendríticas “mieloides”, que expresan el marcador BDCA-1, y “plasmacitoides”, que expresan el marcador BDCA-2, en 125 de los 183 neonatos incluidos en el estudio. Por semanas de gestación (*semana a semana*) (Tabla 5.18), se observó que sólo había diferencias significativas en las células dendríticas mieloides (CD4+BDCA-1+) (Figura 5.22.A). También se observó que en las semanas 32 y 38 los neonatos tuvieron valores significativamente más altos que en el resto de semanas de gestación (Figura 5.22.A), mientras que no se encontraron diferencias significativas entre semanas de gestación en las células dendríticas plasmacitoides (Figura 5.22.B).

Tabla 5.18. Número de muestras en las que se analizaron las subpoblaciones de células dendríticas, por semanas de gestación.

EG	25	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
n	2	3	3	11	2	3	6	6	6	11	10	9	11	14	9	18	1

EG: edad gestacional (semanas), n: n° neonatos por cada semana de gestación.

Figura 5.22. (A) Células dendríticas mieloides (CD4+BDCA-1+). Los valores se mantuvieron constantes para todo el periodo estudiado, excepto para las semanas 32 y 38, donde se observaron incrementos. (B) Células dendríticas plasmacitoides (CD4+BDCA-2+). No se encontraron diferencias significativas entre ninguna de las semanas de gestación. (*) Diferencias significativas con las semanas 29, 33, 36, 37, 39, 40 y 41 ($p < 0,05$). (n.s.), no significación estadística.



Se determinaron los porcentajes de las subpoblaciones de células dendríticas (Tabla 5.19) semana a semana de gestación y por grupos gestacionales (muy pretérmino, pretérmino y a término).

Tabla 5.19. Porcentajes de referencia de las subpoblaciones de células dendríticas de linaje mielóide (BDCA-1+) y linaje plasmacitoide (BDCA-2+).

Edad gestacional (semanas)	N	CD4+BDCA-1+		CD4+BDCA-2+	
		Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)
25	2	0,27	(0 ; 0,53)	0,25	(0 ; 0,49)
27	3	0,12	(0 ; 0,17)	0,03	(0 ; 0,15)
28	3	0,17	(0 ; 0,99)	0,15	(0 ; 0,28)
29	11	0,19	(0,07 ; 0,27)	0,23	(0,05 ; 0,28)
30	2	0,12	(0,08 ; 0,15)	0,20	(0,11 ; 0,28)
31	3	0,10	(0,08 ; 0,15)	0,04	(0,03 ; 0,05)
32	6	0,41	(0,32 ; 2,11)	0,24	(0,14 ; 0,31)
33	6	0,14	(0,10 ; 0,31)	0,13	(0,07 ; 0,18)
34	6	0,14	(0,09 ; 0,51)	0,14	(0,09 ; 0,22)
35	11	0,16	(0,12 ; 0,28)	0,22	(0,15 ; 0,31)
36	10	0,18	(0,15 ; 0,23)	0,19	(0,15 ; 0,25)
37	9	0,16	(0,05 ; 0,24)	0,16	(0,11 ; 0,29)
38	11	0,29	(0,22 ; 0,89)	0,29	(0,16 ; 0,33)
39	14	0,19	(0,12 ; 0,25)	0,20	(0,12 ; 0,33)
40	9	0,17	(0,11 ; 0,24)	0,18	(0,14 ; 0,40)
41	18	0,19	(0,10 ; 0,27)	0,20	(0,16 ; 0,32)
Grupo gestacional	N	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)
≤ 30	21	0,15	(0,07 ; 0,27)	0,15	(0,04 ; 0,28)
31-36	42	0,16	(0,12 ; 0,37)	0,17	(0,12 ; 0,26)
≥ 37	62	0,19	(0,12 ; 0,28)	0,20	(0,15 ; 0,32)

Se describen los valores en Mediana (percentil 25 ; percentil 75), excepto para las semanas 25, 27, 28, 30 y 31 en las que se expresan en Mediana (mínimo ; máximo). Se han resaltado en negrita los valores con diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al resto de semanas de gestación.

5.7. PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

El análisis de progenitores hematopoyéticos se realizó por citometría de flujo en sangre total en 125 de los 183 neonatos incluidos en el estudio, en función de la expresión de los marcadores CD24 (linaje mieloide), CD34 (progenitores hematopoyéticos) y CD133 (en células madre CD34+).

Por semanas de gestación (*semana a semana*) (Tabla 5.20) se observó que la población que se definió para el linaje linfoide (CD133+CD34+CD45+) y la que se definió para el linaje mieloide (CD133+CD34+CD24+) tuvieron el mismo patrón a lo largo del periodo estudiado, con valores más altos en las semanas de gestación más tempranas (Figura 5.23.A,B).

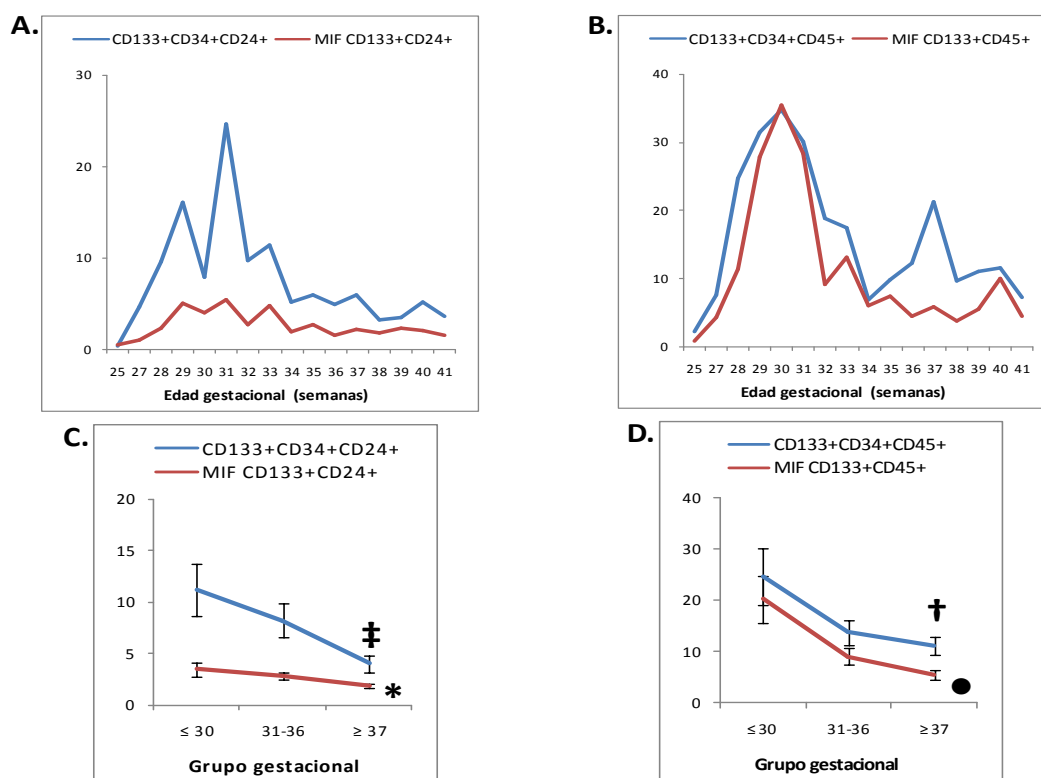
Tabla 5.20. Distribución de muestras por semanas de gestación para el análisis de progenitores hematopoyéticos.

EG	25	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
n	2	3	3	11	2	3	6	6	6	11	10	9	11	14	9	18	1

EG: edad gestacional, n: nº neonatos por cada semana de gestación.

En el análisis por grupos gestacionales [*muy pretérmino* (≤ 30 semanas), n=21; *pretérmino* (31-36 semanas), n=42; *a término* (≥ 37 semanas), n=62], se encontraron diferencias significativas en ambas poblaciones celulares, del grupo *a término* respecto a los grupos *muy pretérmino* y *pretérmino* (Figura 5.23.C,D).

Figura 5.23. Evolución de las poblaciones celulares de progenitores hematopoyéticos. Linaje mieloide (A) semana a semana y (C) por grupos gestacionales, porcentajes y MIF. Linaje linfóide (B) semana a semana y (D) grupos gestacionales (≤ 30 semanas o muy pretérmino, 31-36 sem. o pretérmino y ≥ 37 sem. o a término), porcentajes y MIF. Los símbolos de las gráficas C y D representan diferencias estadísticamente significativas del grupo a término con los grupos muy pretérmino y pretérmino ($p < 0,05$).



Se determinaron los porcentajes de referencia de las subpoblaciones de células progenitoras (Tabla 5.21), semana a semana de gestación y por grupos gestacionales (muy pretérmino, pretérmino y a término).

Tabla 5.21. Valores de referencia en porcentajes de las subpoblaciones de células progenitoras.

Edad gestacional (semanas)	N	CD133+CD34+CD24+		CD133+CD34+CD45+	
		Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)
25	2	0,36	(0 ; 0,72)	2,17	(0 ; 4,33)
27	3	3,63	(0 ; 10,34)	10,36	(0 ; 12,31)
28	3	0,46	(0 ; 28,50)	1,22	(0 ; 73,11)
29	11	16,22	(2,67 ; 27,11)	21,78	(8,31 ; 57,11)
30	2	7,92	(7,52 ; 8,32)	34,84	(21,61 ; 48,07)
31	3	18,59	(15,21 ; 40,00)	23,08	(18,77 ; 48,33)
32	6	5,02	(1,26 ; 21,88)	8,39	(4,43 ; 35,83)
33	6	2,93	(1,15 ; 28,44)	7,39	(2,69 ; 39,67)
34	6	1,14	(0,26 ; 10,81)	3,68	(1,30 ; 12,84)
35	11	2,40	(0,84 ; 8,09)	5,87	(4,35 ; 11,83)
36	10	1,15	(0,62 ; 5,21)	4,80	(2,51 ; 17,71)
37	9	2,00	(0,71 ; 14,41)	19,54	(2,91 ; 38,75)
38	11	2,18	(0,39 ; 5,76)	6,28	(4,08 ; 9,14)
39	14	0,98	(0,41 ; 3,57)	6,35	(1,60 ; 18,93)
40	9	2,26	(0,25 ; 9,78)	4,52	(0,77 ; 21,59)
41	18	0,61	(0 ; 4,55)	3,81	(1,27 ; 13,78)
Grupo gestacional	N	Mediana	(p25 ; p75)	Mediana	(p25 ; p75)
≤ 30	21	7,52	(1,59 ; 21,58)	12,31	(4,46 ; 48,67)
31-36	42	2,70	(0,8 ; 16,06)	6,36	(3,68 ; 22,35)
≥ 37	62	1,01	(0,45 ; 3,99)	5,99	(1,84 ; 16,17)

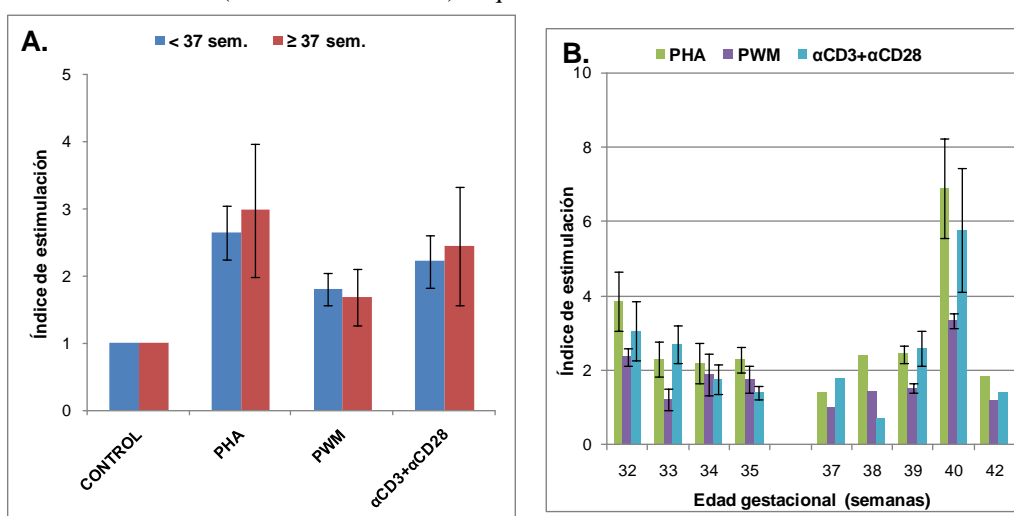
Se describen los valores en Mediana (percentil 25 ; percentil 75), excepto para las semanas 25, 27, 28, 30 y 31 en las que se expresan en Mediana (mínimo ; máximo). Se han resaltado en negrita los valores con diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al resto de semanas de gestación.

5.8. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN.

Se estudió la capacidad de respuesta de las CMSCUs frente a distintos estímulos y las diferencias existentes entre neonatos de distintas edades gestacionales. El cultivo para analizar la proliferación a distintos estímulos (fitohemaglutinina o PHA, *pokeweed mitogen* o PWM, anti-CD3+anti-CD28) se realizó en CMSCUs de 27 de los 183 neonatos incluidos en el estudio, distribuidos *semana a semana* según: semana 32, n=3; s.33, n=5; s.34, n=3; s.35, n=3; s.37, n=1; s.38, n=1; s.39, n=6; s.40, n=4; s.42, n=1, y divididos en dos grupos gestacionales: < 37 semanas, n=14 y ≥ 37 semanas, n=13.

Se observó que las CMSCUs del grupo de neonatos < 37 semanas respondieron a los distintos estímulos de la misma forma que las del grupo de neonatos ≥ 37 semanas (Figura 5.24.A). Además, se observó que sólo las células de los niños de semana 40 tuvieron un índice de estimulación mayor que el resto de niños, aunque esta diferencia no fue significativa (Figura 5.24.B).

Figura 5.24. Prueba funcional de la capacidad de estimulación de las células mononucleares de sangre de cordón umbilical (CMSCUs). (A) por grupos gestacionales (< 37 semanas, n=14 y ≥ 37 semanas, n=13), (B) por semanas de gestación. Sólo se observan diferencias en los neonatos de la semana 40, en la que la estimulación fue 2 ó 3 veces mayor que en el resto de neonatos incluidos en el estudio. Todos los valores están referidos al control (células sin estimular) al que se le dio el valor 1.

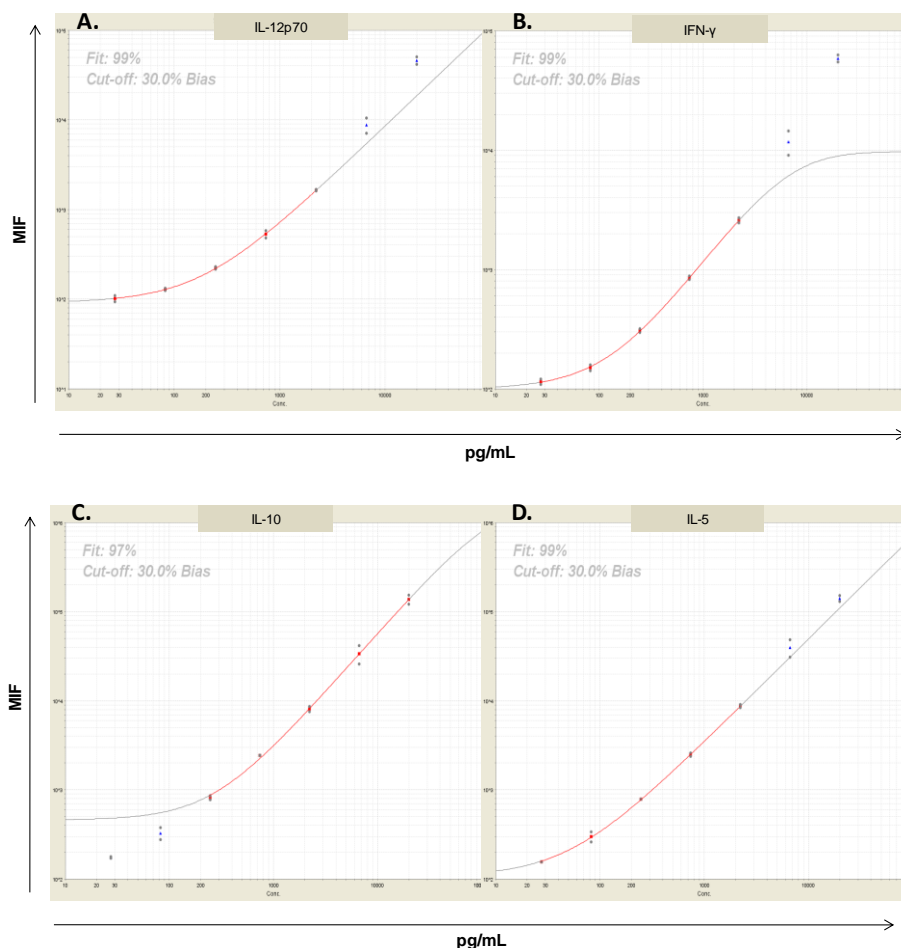


5.9. BALANCE TH1/TH2.

El balance en la respuesta celular en neonatos se encuentra desviado hacia una respuesta Th2, para evitar el rechazo del sistema inmune materno. Para analizar las posibles diferencias en el balance inmunitario en neonatos de distintas edades gestacionales, se cuantificaron por citometría de flujo las citocinas IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- α y TNF- β , en el plasma de 77 de los 183 neonatos incluidos en el estudio, divididos según su edad gestacional en: *muy pretérmino* (n=23), *pretérmino* (n=27) y *a término* (n=27).

La *Figura 5.25*. muestra, como ejemplo, las curvas estándar generadas para IL-12p70, IFN- γ , IL-10 e IL-5, sobre las que posteriormente se extrapolaron los valores de MIF obtenidos para cada muestra.

Figura 5.25. Curvas estándar para (A) IL-12p70 (LD=, (B) IFN- γ , (C) IL-10 y (D) IL-5. El límite de detección (LD) para cada citocina fue el último punto que se aceptó como válido para obtener un ajuste de la curva de más del 97%



En ninguna de las 77 muestras de plasma analizadas se encontraron valores detectables de las citocinas IL-1 β , TNF- β , IL-4 e IL-10.

Sólo en el plasma de 9 recién nacidos del grupo *muy pretérmino* y 9 del grupo *pretérmino* se encontraron valores detectables de algunas de las citocinas. En las muestras analizadas de los 18 neonatos, se detectaron un máximo de 3 citocinas por niño, siendo el patrón más repetido IL-12p70+IFN- γ , en los 9 neonatos *muy pretérmino* y los 9 *pretérmino* (Tabla 5.22).

Tabla 5.22. Valores (pg/mL) de las citocinas que se cuantificaron en el plasma de los neonatos, divididos por grupos de edad gestacional (*muy pretérmino, pretérmino y a término*).

	Grupo Gestacional	N	Mediana (pg/mL)	(p25,p75)
IL-2	≤ 30	2	145,2	(141,2;149,1)
	31-36	4	216,6	(117,2;322,7)
IL-8	≤ 30	4	890,7	(630,2;1710,5)
	31-36	2	242,3	(89,3;395,4)
IL-12p70	≤ 30	4	65,0	(55,0;81,7)
	31-36	8	81,6	(44,6;143,6)
IFN-γ	≤ 30	4	31,8	(20,3;39,6)
	31-36	6	40,1	(16,8;133,0)
TNF-α	≤ 30	1	45,3	-
	31-36	1	73,0	-
IL-5	31-36	2	9,3	-
IL-6	≤ 30	2	422,9	-
	31-36	1	.	-

Los valores descritos son la Mediana y rango intercuartílico (percentil 25, percentil 75) de cada grupo gestacional. Para las citocinas TNF- α , IL-5 e IL-6, no se pudo calcular el rango intercuartílico por ser valores constantes.

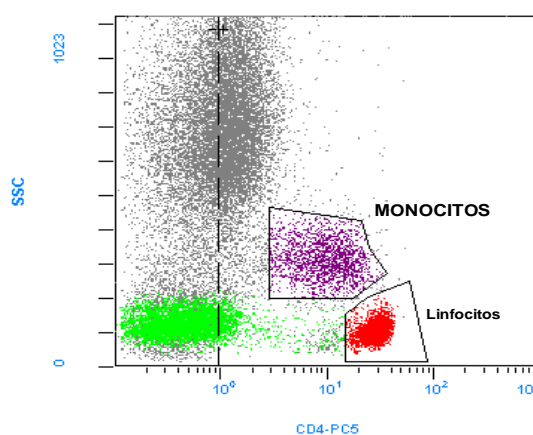
5.10. MONOCITOS.

Se purificó la subpoblación de monocitos CD14+ de sangre de cordón umbilical de 65 de los 183 neonatos incluidos en el estudio, que se dividieron por grupos gestacionales: *muy pretérmino* (n= 11), *pretérmino* (n= 19), *a término* (n= 35). Los monocitos CD14+ se estimularon con LPS o con LPS+IFN γ . Como control se utilizaron monocitos CD14+ sin estimular.

5.10.1. SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS CD4+ EN SANGRE TOTAL.

En primer lugar, se analizaron las distintas poblaciones de monocitos en sangre de cordón umbilical por citometría de flujo. Para ello, se creó una puerta en el *plot* o gráfico en el que se representó a las células que expresaban el receptor CD4 (*Figura 5.26*) y se diseñaron otros *plots* respecto al anterior en los que se determinó la expresión de los marcadores HLA-DR, CD38 y CD45RO en monocitos CD4+.

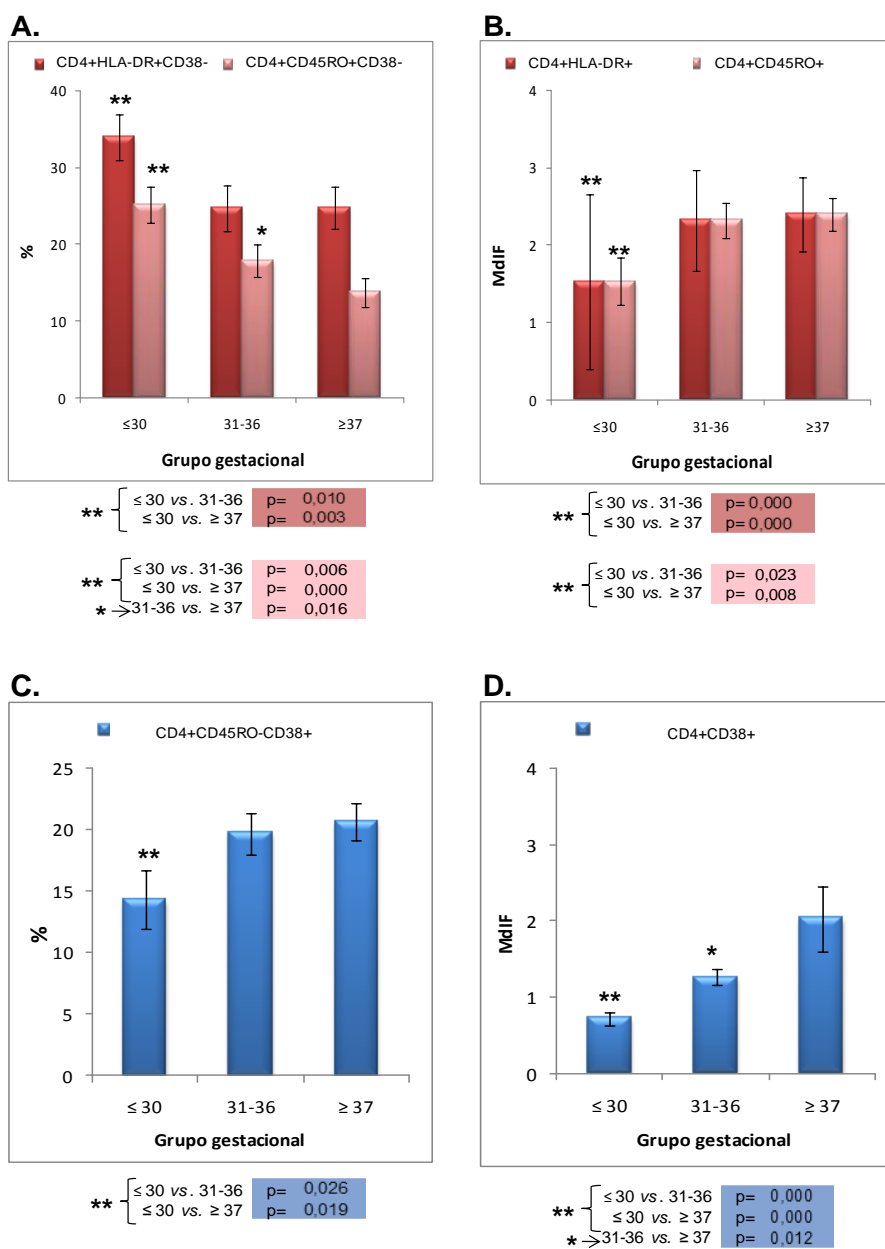
Figura 5.26. Imagen del *plot* o gráfico en el que se diseñó la puerta específica para determinar los monocitos CD4+ en sangre total.



Los neonatos del grupo *muy pretérmino* tuvieron un porcentaje significativamente mayor de monocitos CD4+ que expresaban HLA-DR y CD45RO (*Figura 5.27.A*). Sin embargo, al analizar la mediana de intensidad de fluorescencia (MdIF) se observó que dicho grupo expresaba menor número de estos marcadores en la superficie de estas células (*Figura 5.27.B*). Por el contrario, se observó que la expresión

de CD38 aumentó en los distintos grupos gestacionales, tanto en porcentaje de células que lo expresaban como en número de moléculas en la superficie de dichas células (Figura 5.27.C,D).

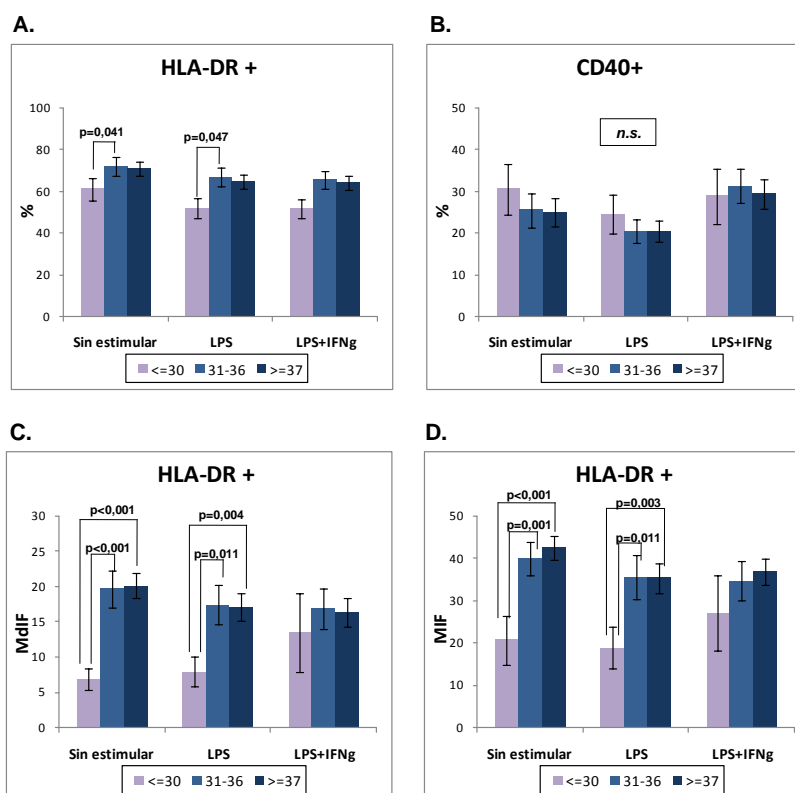
Figura 5.27. Diferencias entre grupos gestacionales en subpoblaciones de monocitos CD4+. (A) Porcentajes de monocitos HLA-DR+ y CD45RO+. (B) Mediana de intensidad de fluorescencia (MdlF) de la expresión de HLA-DR y CD45RO. Expresión de CD38 en monocitos: (C) porcentajes y (D) MdlF. Se representan las diferencias entre los distintos grupos y su significación estadística.



5.10.2. CAPACIDAD DE PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO Y COESTIMULACIÓN EN MONOCITOS CD14+ ACTIVADOS.

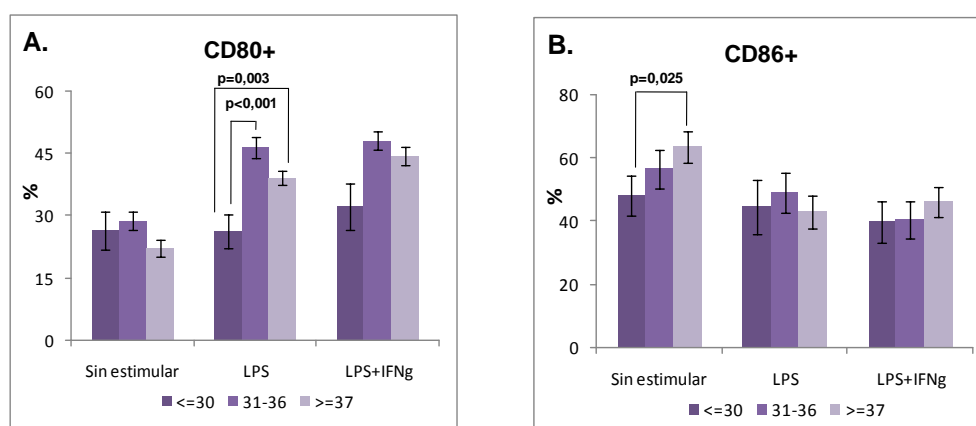
La presentación de antígeno al linfocito T por parte de los monocitos es clave en las primeras fases de la respuesta inmune. Por ello, se analizó la expresión de marcadores de presentación de antígeno, como HLA-DR y CD40, en monocitos CD14+ estimulados con LPS o LPS+IFN γ . No se observaron diferencias significativas entre los 3 grupos gestacionales en el porcentaje de células que expresaban CD40 (*Figura 5.28.B*). Sin embargo, se observó que el grupo *muy pretérmino* tuvo un porcentaje y un número de moléculas HLA-DR en la superficie celular, medida como intensidad de fluorescencia (tanto la media, MIF, como la mediana, MdIF), significativamente más bajo que los grupos de niños *pretérmino* y *a término* (*Figura 5.28.A,C,D*).

Figura 5.28. Diferencias entre grupos gestacionales y significación estadística en la expresión de marcadores de presentación de antígeno en monocitos CD14+ activados (LPS o con LPS+IFN γ). **(A)** Porcentaje de células HLA-DR+. **(B)** Porcentaje de células CD40+. Expresión de HLA-DR, en términos del número de moléculas expresadas en superficie, en mediana de intensidad de fluorescencia (MdIF) **(C)**, y en media (MIF) **(D)**. (*n.s.*): no significación estadística.



Cuando se analizó la capacidad coestimuladora de monocitos tratados con LPS se observó que el porcentaje de moléculas de la familia B7, CD80, se incrementó de forma significativa en los grupos *pretérmino* y *a término*, en comparación con el grupo *muy pretérmino* (Figura 5.29.A). Sin embargo, al estimular los monocitos CD14+ con LPS+IFN γ se observó que el porcentaje de CD80 y CD86, de la familia B7, no varió en ninguno de los tres grupos gestacionales (Figura 5.29.A,B).

Figura 5.29. Expresión de moléculas coestimuladoras (familia B7), CD80 (A) y CD86 (B) en monocitos CD14+ activados. Se representan las diferencias entre los distintos grupos, según estímulo, y su significación estadística.

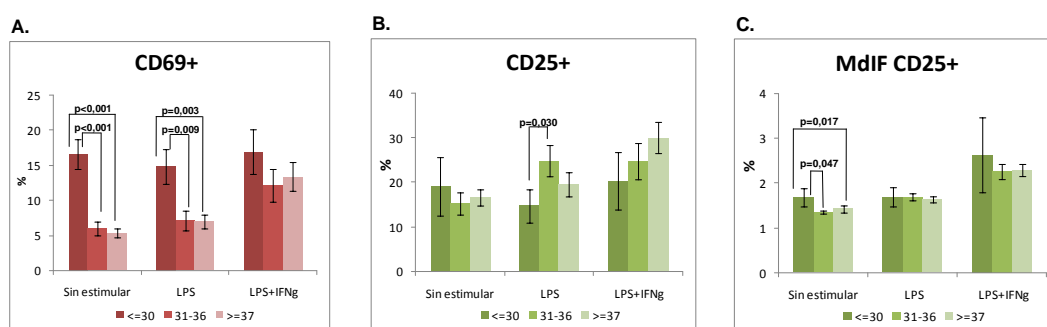


5.10.3. MARCADORES DE ACTIVACIÓN EN MONOCITOS CD14+.

Se analizó la capacidad de activación, mediante la expresión de marcadores de activación temprana (CD69) y activación media o tardía (CD25), en monocitos CD14+ aislados de sangre de cordón umbilical procedente de 65 de los 183 neonatos incluidos en esta Memoria, divididos por grupos gestacionales (*muy pretérmino*, *pretérmino* y *a término*). Se encontraron porcentajes de células CD69+ significativamente más altos en el grupo *muy pretérmino*, en células sin estimular y en células estimuladas con LPS (Figura 5.30.A). Sin embargo, se observó un incremento en la expresión de CD69 en monocitos tratados con LPS+IFN γ los grupos *pretérmino* y *a término*, aunque las diferencias no fueron significativas (Figura 5.30.A). En la expresión del marcador CD25, no se observaron diferencias significativas en porcentajes entre los tres grupos de

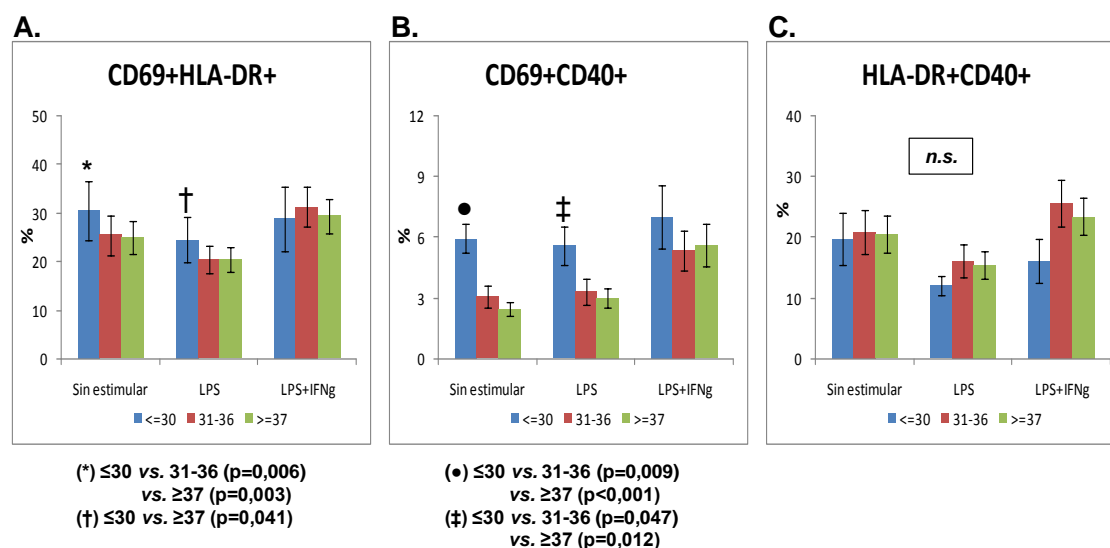
neonatos (*Figura 5.30.B*); sin embargo, el número de moléculas CD25 (MdIF) que expresaban los monocitos en su superficie fue significativamente más alta en los neonatos del grupo *muy pretérmino* cuando las células no estaban estimuladas (*Figura 5.30.C*). Además, se observó un incremento en la expresión de CD25 en los monocitos tratados con LPS y LPS+IFN γ en los 3 grupos de neonatos, pero no se encontró significación estadística en este incremento (*Figura 5.30.B,C*).

Figura 5.30. Expresión de marcadores de activación, en monocitos CD14+ sin estimular y estimulados con LPS o LPS+IFN γ medida por citometría de flujo. (A) Activación temprana: porcentaje de células CD69+. Activación tardía: expresión de porcentaje de células CD25+ (B) y en términos de Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MdIF) (C). Se representan las diferencias entre los distintos grupos y su significación estadística.



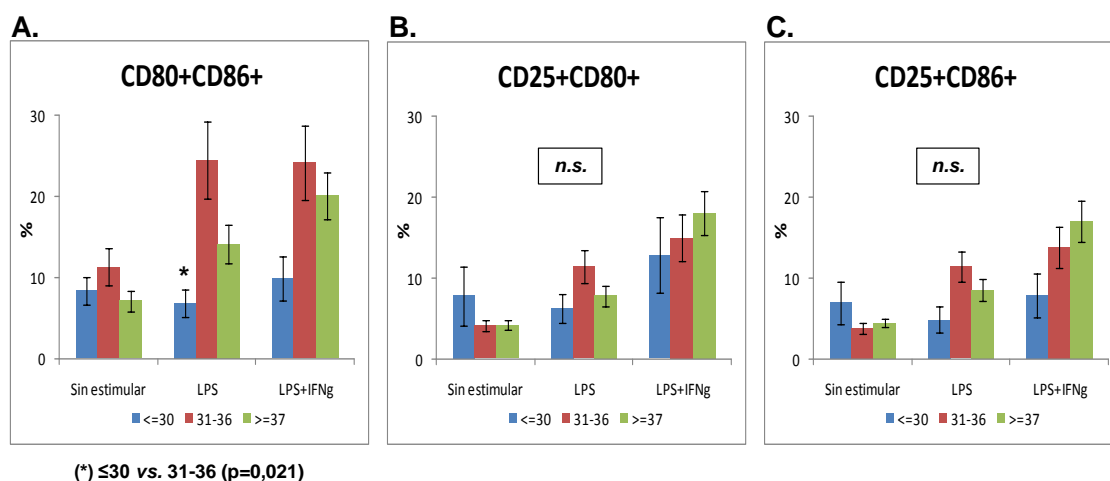
Cuando se analizaron las poblaciones dobles-positivas CD69+CD40+ y CD69+HLA-DR+, que representan las *células presentadoras de antígeno* (CPAs), se observó que los niños *muy pretérmino* presentaban un mayor porcentaje de dichas poblaciones, en células sin estimular y en células tratadas con LPS, existiendo diferencias significativas con los grupos *pretérmino* y *a término* (*Figura 5.31.A,B*). En cuanto a las poblaciones que coexpresaban HLA-DR y CD40, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos con ninguno de los estímulos utilizados, LPS o LPS+IFN γ (*Figura 5.31.C*).

Figura 5.31. Células presentadoras de antígeno (CPAs) o monocitos CD14⁺ que coexpresan los marcadores CD69 y HLA-DR (A), CD69 y CD40 (B) o HLA-DR y CD40 (C). Se representan las diferencias entre los distintos grupos y su significación estadística. (*n.s.*): no significación estadística.



Las poblaciones de monocitos CD14⁺ que coexpresaban moléculas de la familia B7 y el marcador CD25 no variaron en ninguno de los tres grupos de neonatos (Figura 5.32), pero se observó un aumento en el porcentaje de estas subpoblaciones en monocitos tratados con LPS y LPS+IFN γ en los grupos *pretérmino* y *a término* (aunque este aumento no fue significativo) (Figura 5.32).

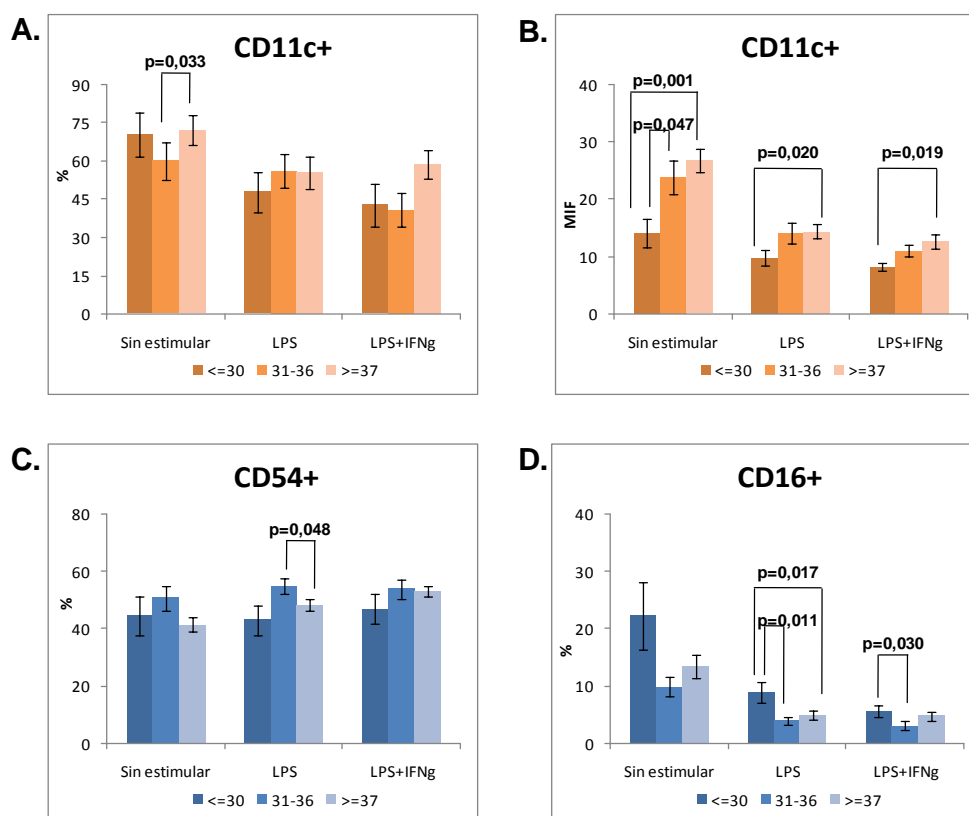
Figura 5.32. Porcentajes de poblaciones de monocitos con coexpresión de moléculas coestimuladoras y de activación tardía. Se representan las diferencias entre los distintos grupos y su significación estadística. (n.s.): no significación estadística.



5.10.4. MARCADORES DE ADHESIÓN EN MONOCITOS CD14+.

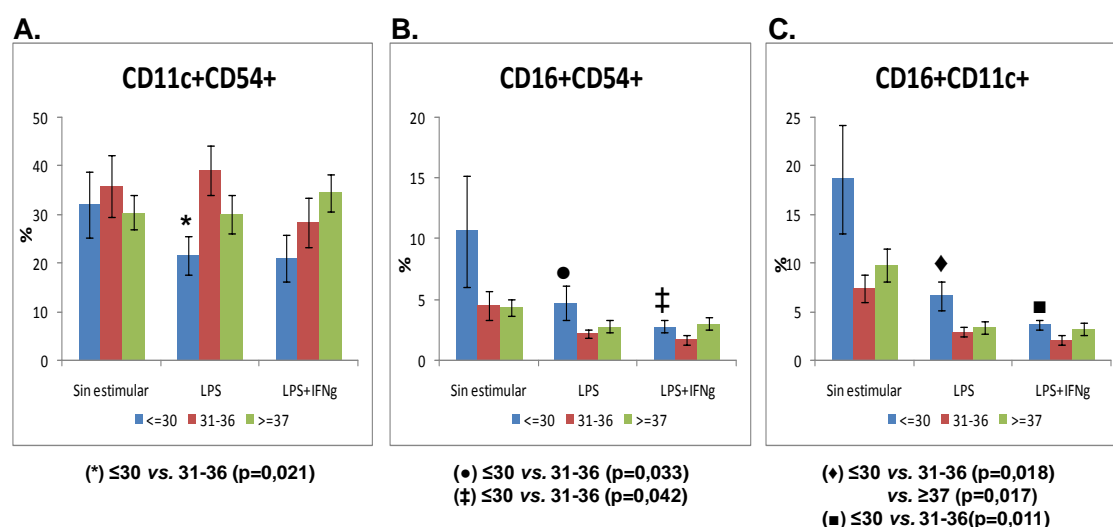
Para analizar la capacidad de adhesión de los monocitos neonatales, se estudió la expresión de moléculas de adhesión en monocitos CD14+ activados, como CD11c, CD54 (o ICAM-1) y CD16 (un receptor Fc). Se observó que no existían diferencias significativas en los porcentajes de monocitos CD54+ y CD11c+ entre los tres grupos de niños (Figura 5.33.A,C). Sin embargo, se observó que el número de moléculas CD11c expresadas en la superficie celular, medidas como la media de intensidad de fluorescencia (MIF), fue significativamente mayor en neonatos *pretérmino* y *a término*, tanto en monocitos no estimulados como estimulados con LPS y LPS+IFN γ (Figura 5.33.B). Además, cuando se trataron los monocitos CD14+ con LPS y LPS+IFN γ se observó una disminución en el porcentaje de células CD16+ en neonatos *pretérmino* y *a término* (Figura 5.33.D).

Figura 5.33. Expresión de moléculas de adhesión en monocitos CD14⁺ activados: porcentaje de CD11c (A), de CD54 (C) y de CD16 (D). (B) Diferencias en el número de moléculas de CD11c en términos de MIF. Se representan las diferencias entre los distintos grupos y su significación estadística.



Al analizar las poblaciones dobles positivas para los marcadores de adhesión, se observó que el porcentaje de células que coexpresaban CD16 y CD11c o CD54 fue significativamente mayor en el grupo *muy pretérmino* (Figura 5.34.A-C).

Figura 5.34. Porcentajes de poblaciones de monocitos con coexpresión de moléculas e adhesión. Se representan las diferencias entre los distintos grupos y su significación estadística.



5.10.5. PRODUCCIÓN DE CITOCINAS POR MONOCITOS CD14+ ACTIVADOS.

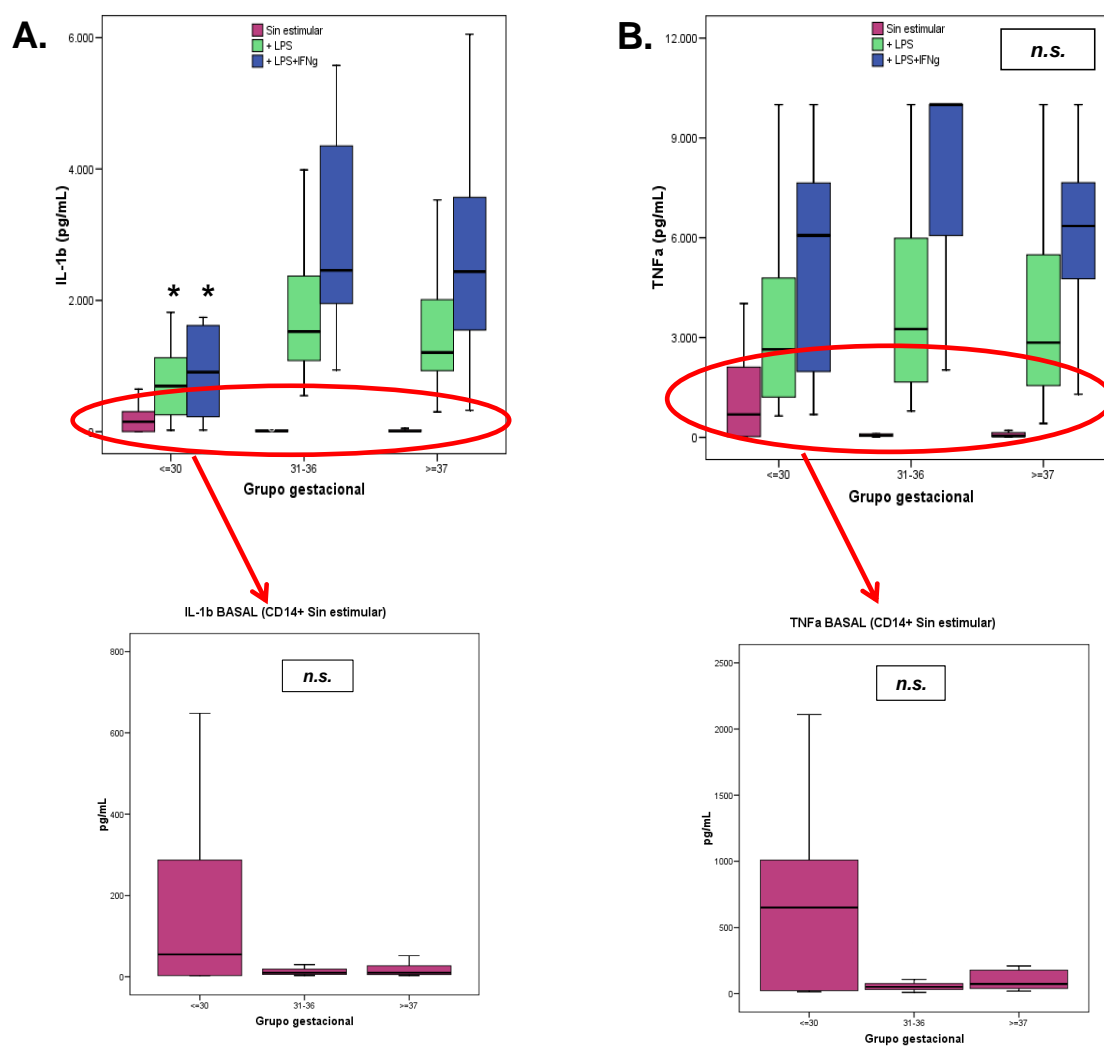
Se cuantificó la producción de citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 (p40), TNF- α y TGF- α en el sobrenadante de cultivos de monocitos CD14+ estimulados con LPS o LPS+IFN γ de 51 niños de los 183 incluidos en el estudio, divididos según la edad gestacional (10 del grupo *muy pretérmino*, 20 *pretérmino* y 21 del grupo *a término*).

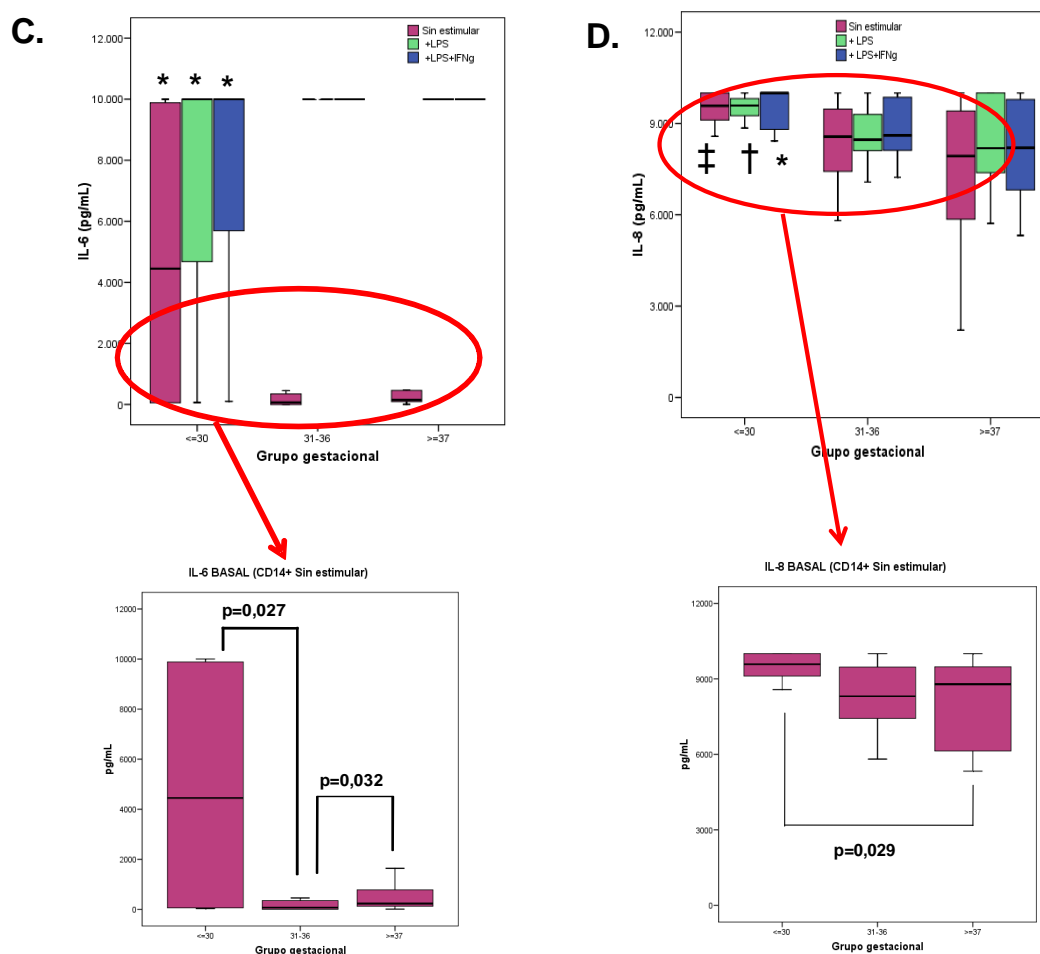
5.10.5.1. Citocinas proinflamatorias.

En los tres grupos gestacionales, se observó un incremento de los valores de citocinas proinflamatorias cuando se estimularon los monocitos CD14+ con LPS o LPS+ IFN γ . Cuando se compararon los tres grupos según edad gestacional, se observó que en los neonatos *muy pretérmino* (≤ 30 semanas) hubo una producción basal mayor de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF α , IL-6 e IL-8) que en los otros dos grupos de neonatos (Figura 5.35.A-D), pero sólo se encontraron diferencias significativas en los valores de IL-6 e IL-8 de monocitos CD14+ no estimulados (Figura 5.35.C,D). Cuando

se estimularon los monocitos CD14+ con LPS o LPS+ IFN γ los valores de IL-6 e IL-8 fueron superiores al límite de detección de la técnica.

Figura 5.35. Citocinas proinflamatorias medidas en el sobrenadante de los cultivos de activación de monocitos CD14+. (A) IL-1 β , (B) TNF α , (C) IL-6, (D) IL-8. Se representan las diferencias entre los distintos grupos y su significación estadística a nivel basal (células sin estimular). (*) Diferencias con 31-36 y con ≥ 37 . (†) Diferencias con 31-36. (‡) Diferencias con ≥ 37 . (n.s.): no significación estadística.





5.10.5.2. Inducción de una respuesta Th1: producción de IL-12(p40).

Se analizó la producción de IL-12(p40) como medida de la capacidad de inducir una respuesta Th1 por los monocitos neonatales. Se observó que los monocitos CD14+ de los tres grupos de neonatos fueron capaces de responder a LPS y LPS+IFN γ de manera similar. Aunque la respuesta fue siempre mayor cuando los monocitos fueron tratados con LPS+IFN γ , se observó que los neonatos del grupo *muy pretérmino* indujeron una respuesta Th1 más débil, con respecto a los otros dos grupos de neonatos, pero las diferencias no fueron significativas (Figura 5.36).

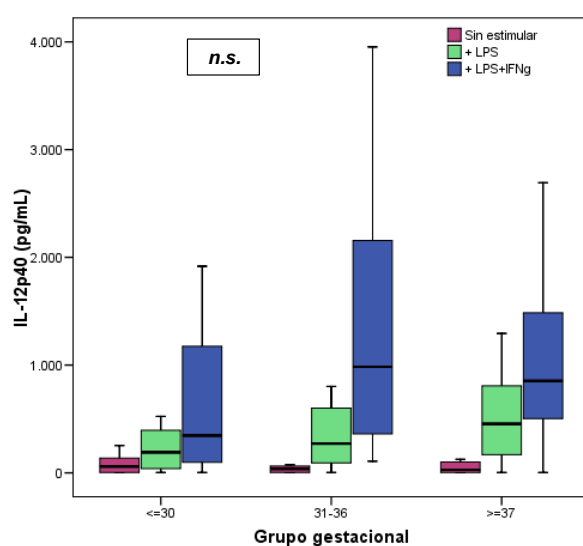
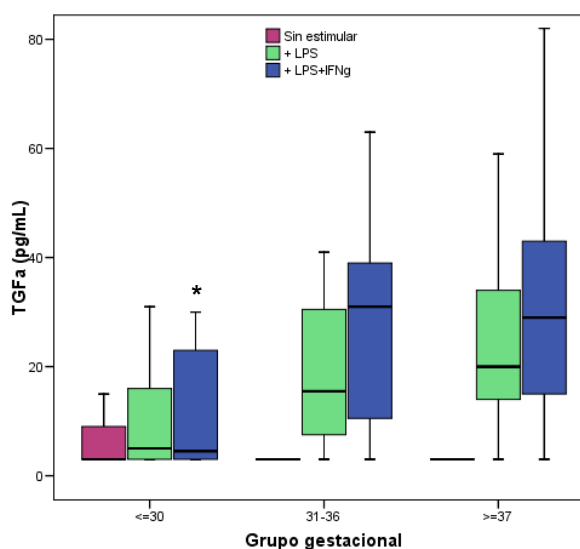


Figura 5.36. Producción de IL-12(p40) como medida de la capacidad de inducir una respuesta Th1 por monocitos CD14+ activados.

5.10.5.3. Quimiotaxis: producción de TGF α .

Una vez en el sitio de la infección, los monocitos producen quimiocinas, como TGF α , para inducir el reclutamiento de otros tipos celulares en la defensa ante el patógeno. Cuando se cuantificó la producción de TGF α , se observó que los monocitos CD14+ procedentes del grupo de neonatos *muy pretérmino* produjeron valores significativamente más bajos de dicha quimiocina que los otros dos grupos de neonatos, encontrándose diferencias significativas entre los tres grupos cuando se estimularon los monocitos CD14+ con LPS+IFN γ (Figura 5.37).

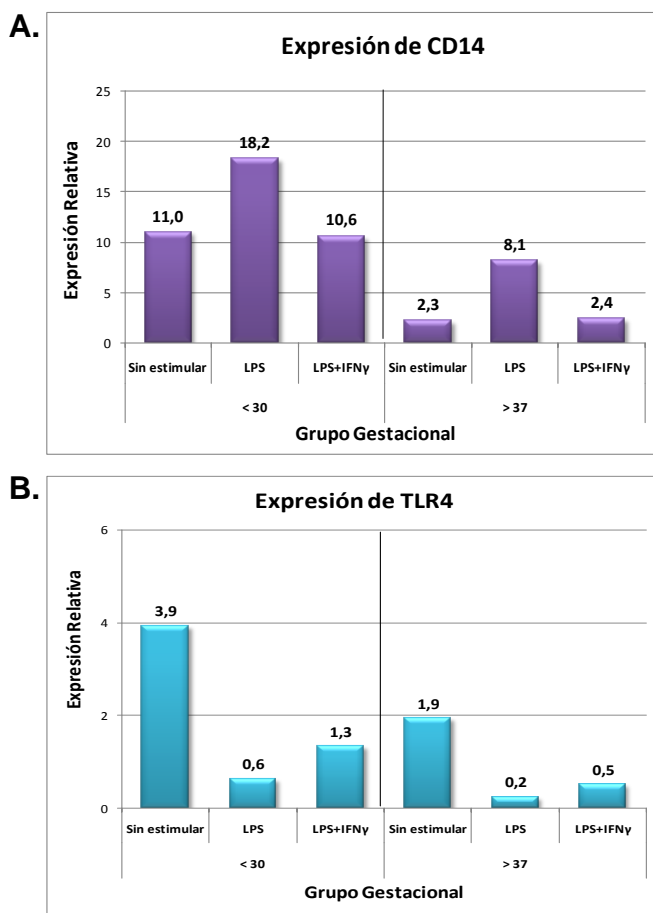
Figura 5.37. Producción de TGF α , en función de la capacidad de quimiotaxis de los monocitos CD14+ activados de cada grupo gestacional. El grupo *muy pretérmino* fue el único que mostró valores detectables (por encima del nivel inferior de la técnica) a nivel basal.



5.10.6. DIFERENCIAS EN LA RUTA DE TLR4.

Debido a la mayor capacidad de activación de los monocitos CD14+ del grupo *muy pretérmino*, se estudió si esta capacidad se daba también a nivel molecular. Se midió la expresión de CD14 y TLR4, como cantidad de ARNm, en un total de 9 neonatos, 5 del grupo *muy pretérmino* (semanas de gestación de 27 a 30) y 4 del grupo *a término* (semanas 38 a 41). Se observó que los neonatos *muy pretérmino* mostraron valores más altos de expresión de ambos receptores, observándose que esta diferencia fue cuantitativamente mayor en los monocitos CD14+ sin estimular (Figura 5.38.A,B).

Figura 5.38. Expresión relativa del ARNm de CD14 (**A**) y TLR4 (**B**) de los monocitos CD14+ activados de los grupos gestacionales de los extremos. Para normalizar las cantidades obtenidas en cada caso, se utilizó el gen constitutivo 18s.



6.DISCUSIÓN

El sistema inmune consiste en una compleja red de interacciones entre células y moléculas, organizadas para actuar de forma efectiva frente a procesos dañinos para el organismo. Sin embargo, se conoce poco sobre las características del sistema inmune del neonato, así como sobre su desarrollo a lo largo de la gestación, desde un periodo *muy pretérmino* (semana 25 de gestación) hasta el periodo *a término* o final de la gestación. Por eso, el objetivo de esta Memoria ha sido doble: por un lado, establecer valores de referencia de las diferentes poblaciones y subpoblaciones celulares en neonatos sanos nacidos en diferentes semanas gestacionales; por otro lado, establecer una secuencia (inmunológica) que explique la maduración del sistema inmune a lo largo del último periodo de la gestación (desde la semana 25 hasta el final). De tal manera que dichos valores de referencia puedan aplicarse a los neonatos con alguna patología congénita y, con el conocimiento de la secuencia del desarrollo y maduración del sistema inmune, se pueda encontrar la causa de la patología y una mejor forma de incrementar la respuesta inmunológica de dichos neonatos. En resumen, en esta Memoria, se ponen de manifiesto algunas de las diferencias inmunológicas, tanto fenotípicas como funcionales, entre neonatos de diferentes edades gestacionales.

Es importante destacar que los neonatos incluidos en esta Memoria nacieron de madres sanas, sin antecedentes clínicos ni obstétricos de riesgo. Más del 60% fueron madres menores de 35 años, tuvieron gestaciones anteriores y un adecuado control de la gestación. Además, el tiempo de *rotura prematura de membranas*, que se considera un factor de riesgo de infección perinatal, fue inferior a 24 horas. Para analizar qué factores influyeron en la prematuridad, se realizaron análisis multivariantes en los que se observó que el riesgo de parto prematuro o muy prematuro se incrementaba cuando no

existía un control adecuado de la gestación y/o cuando las madres tomaban fármacos ajenos a la historia natural del parto, por alguna patología asociada o no a la gestación.

Se estudiaron neonatos del periodo *pretérmino* con el propósito de establecer si existían diferencias claras entre éstos y los que nacen *a término*. Está descrito que los neonatos prematuros tienen un alto riesgo de padecer infecciones, posiblemente por la inmadurez de su sistema inmune. Las funciones celulares y humorales del sistema inmune juegan un papel decisivo a la hora de montar una respuesta inmunológica efectiva durante las primeras horas de vida y hay varios estudios que muestran que la respuesta inmune de los neonatos *pretérmino* no tiene la misma potencia que los neonatos *a término* [42, 43]. Además, está descrito que los neonatos de un peso extremadamente bajo al nacer tienen una respuesta inmune de primera línea menor o reducida [44, 45]. En esta Memoria, se analizó la asociación entre la edad gestacional y el peso al nacer, obteniéndose una correlación lineal positiva entre ambas variables; es decir, el peso al nacer se correspondió con la edad gestacional, por lo que no se ha hecho distinción en los resultados obtenidos entre neonatos prematuros y neonatos de bajo peso al nacer.

Por otro lado, hay varios estudios que describen las diferencias en el fenotipo inmunológico (subpoblaciones celulares) y en la función de los linfocitos entre neonatos sanos, niños y adultos [46, 47], y la relación existente entre las características inmunológicas y el tipo de parto [38, 48], el uso de esteroides antenatales [49, 50] y la preeclampsia materna [38]. Sin embargo, los valores de poblaciones y subpoblaciones celulares presentados en esta Memoria no se vieron afectados por ninguno de estos factores, ya que sólo se admitieron en el estudio 14 casos en los que se administraron esteroides antenatales y 6 en los que se presentó pre-eclampsia materna; además,

cuando se realizó el análisis estadístico excluyendo estos casos, no se encontró variación en los resultados con respecto al análisis en el que se incluyeron todos los casos.

Las subpoblaciones celulares juegan un papel fundamental en la respuesta inmune. Uno de los objetivos de esta Memoria es describir los valores de referencia de las diferentes subpoblaciones celulares en neonatos sanos de acuerdo a su edad gestacional, con las diferencias en la composición de las mismas a lo largo del último periodo de la gestación, *semana a semana* (de la semana 25 a la semana 41) y por grupos gestacionales (*muy pretérmino, pretérmino y a término*), para en un futuro poder conocer qué subpoblaciones celulares pueden estar implicadas en diferentes patologías del neonato, como patologías inmunológicas congénitas, sepsis neonatal, distress respiratorio o displasia broncopulmonar y encontrar nuevas dianas de tratamiento.

Los valores de referencia, que por primera vez se describen como representativos de cada subpoblación celular, se han obtenido de sangre de cordón umbilical y es probable que, aunque no se ha estudiado por razones éticas, en sangre periférica extraída en el momento del nacimiento los valores de referencia sean los mismos. En este sentido, los valores absolutos de referencia obtenidos de la semana 25 a la semana 41 en las poblaciones celulares T, B y NK fueron sensiblemente más bajos que los descritos en un estudio previo [47], aunque en dicho estudio el análisis de poblaciones celulares se realizó a las 6-8 semanas posteriores al nacimiento.

En este apartado hay que tener en cuenta las limitaciones de los datos obtenidos al realizar estudios estadísticos, ya que debido a que se manejó un gran número de grupos (las semanas gestacionales, de la 25 a la 41) había un gran número de variables y de comparaciones, por lo que la tasa de error que se pudo cometer fue también alta. Esto

fue debido, fundamentalmente, al error tipo I, que determina que no todas las diferencias estadísticamente significativas obtenidas son reales, sino que un determinado porcentaje de las mismas se debe al azar. Pero es importante analizar tendencias y diferencias significativas y considerar su valor biológico.

Los valores de referencia absolutos (células/mm³) *semana a semana* de gestación, descritos para linfocitos totales (CD45+) fueron significativamente más bajos en la semana 36 y este descenso se correspondió con un descenso de las poblaciones celulares T (CD3+, CD4+ y CD8+) y células B. Estos datos implican que el balance linfocitario se mantiene en la semana 36 de la misma forma que en el resto de semanas de gestación. Este balance se observó también en los valores de referencia relativos (porcentajes), ya que los valores más bajos de linfocitos T CD3+ y T CD4+ y los valores más altos de células NK se observaron en las semanas 38 y 41.

En los valores de referencia encontrados *semana a semana* para las subpoblaciones de células T CD3+ inmaduras (CD3+CD62L+CD2+) se observaron valores significativamente más bajos en las últimas semanas de gestación (39, 40 y 41). Respecto a las subpoblaciones activadas de fenotipo inmaduro (CD3+CD1aCD71, CD3+CD25+CD1a+), los valores más bajos se encontraron en la semana 36 de gestación. Sin embargo, cuando se analizaron los valores de referencia por grupos gestacionales (*muy pretérmino, pretérmino y a término*), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los tres grupos. Estos datos indican que los valores de referencia de subpoblaciones de células T CD3+ inmaduras por semanas de gestación deberán considerarse como patológicos sólo si se encuentran por debajo del 40-50% de mediana, que son los valores del percentil 25 para las semanas 39 y 40

de gestación, que fueron las semanas *a término* en las que se encontraron los valores más bajos.

No se encontraron diferencias significativas en los valores de referencia de células T CD4+ y T CD8+ virgen (CD27+CD45RA+) en los neonatos analizados *semana a semana* o por grupos gestacionales, y todos los valores se encontraron por encima del 90% de mediana. Estos datos indican que todos los neonatos, independientemente de la semana de gestación de nacimiento, tienen valores de subpoblaciones de células virgen similares. Estos valores obtenidos en subpoblaciones de células virgen son muy importantes ya que pueden contribuir a detectar problemas a nivel de la función tímica, ya que un descenso en el porcentaje de células virgen, por debajo de los valores de referencia descritos, podrían hacer sospechar de un defecto de la función tímica del recién nacido. Pero también podría tratarse de un fallo inmunológico que predisponga al neonato a una infección, pues un estudio reciente postula que el descenso en el porcentaje de células CD45RA+ está asociado con el desarrollo de sepsis neonatal [51].

Varios estudios han mostrado que el fenotipo “virgen” CD45RA+ es mucho más frecuente en neonatos y niños, mientras que el fenotipo “memoria” CD45RO+ es mucho más frecuente en adultos, explicando la inmadurez de las subpoblaciones T en neonatos y niños [52-55]. En esta Memoria, se establecen los valores de referencia para las células de memoria, no observándose diferencias significativas ni en el estudio *semana a semana* ni por grupos gestacionales. Así, estos datos indican que porcentajes superiores a los valores de referencia mostrados en esta Memoria en células T CD4+ memoria (CD4+CD45RO+) podrían alertar de la existencia de una posible infección, como ya han descrito otros investigadores [51, 56, 57].

Los valores de referencia descritos para la subpoblación de células B con capacidad de migrar a ganglio (CD19+CD62L+CD40+) no se diferenciaron significativamente de una semana de gestación a otra, lo que indicaría que los linfocitos B neonatales, independientemente de la edad gestacional del neonato, tienen capacidad para desplazarse al lugar donde se producen las primeras fases de la respuesta inmunitaria. Sin embargo, se observaron valores de referencia más altos en la subpoblación de células B presentadoras de antígeno (CD19+CD40+HLA-DR+) en las últimas semanas gestacionales. Estos datos indican la inmadurez que tienen los neonatos nacidos *pretérmino* para desarrollar una respuesta humoral efectiva. Los valores de las subpoblaciones de células B que expresan el marcador CD5+ son normalmente más altos en neonatos y niños que en los adultos [38]. Por eso, cuando se observe un descenso en los porcentajes (valores de referencia relativos) de células B CD5+ en neonatos se podría pensar en la existencia de algún factor externo de estrés, como la preeclampsia materna [38]. Pero además, las células B CD5+ tienen un papel clave en el control de la inflamación en neonatos [58], por lo que unos porcentajes más bajos que los valores de referencia descritos en esta Memoria podrían hacer sospechar de una infección subyacente [58].

Al analizar las subpoblaciones de células NK que expresaban los marcadores específicos Kir-NKAT2 y Kir-p70, se observaron los valores de referencia más altos en las últimas semanas de gestación (semana 38 a 41) o periodo *a término*. Estos datos podrían indicar que los neonatos que presenten valores más bajos de estas subpoblaciones de células NK podrían ser más susceptibles a tener infecciones víricas [59], ya que las moléculas KIR, cuando no encuentran su receptor en la célula diana porque esté ausente o alterado por causa de una infección viral, un factor de estrés o una

neoplasia, inducen a la célula NK a destruir a la célula diana con mal funcionamiento [60, 61].

Cuando se analizaron los valores de referencia de las subpoblaciones de células dendríticas, se encontraron los valores más altos de células plasmacitoides (BDCA-2+) en el grupo de neonatos *a término*. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre grupos gestacionales en la subpoblación de células dendríticas mieloides (BDCA-1+). Este aumento de células BDCA-2+, pero no de células BDCA-1+, podría indicar que existe una tendencia a la respuesta Th2 [62]. Además, un porcentaje bajo de células BDCA-2+ y un porcentaje alto de células BDCA-1+ se ha asociado con un incremento en la inmunidad tipo Th1, en pacientes que presentaban pre-eclampsia [62].

Como era de esperar, se observó una caída en el porcentaje de las subpoblaciones de células progenitoras (CD133+CD34+CD24+ y CD133+CD34+CD45+) a medida que aumentó la edad gestacional, es decir, se observaron los valores más bajos en el grupo de neonatos *a término* cuando se realizó el análisis por grupos gestacionales. Estos datos son de gran interés, ya que si se observaran valores más altos que los descritos en esta Memoria como de referencia de las subpoblaciones de células progenitoras en las últimas semanas de gestación, se podría sospechar de la existencia de una neoplasia en el neonato, ya que en gran parte de los procesos neoplásicos se han detectado células progenitoras (CD34+) como origen del tumor [63].

Además de la determinación de los valores de referencia descritos de poblaciones celulares T, B y NK y de las distintas subpoblaciones linfocitarias (T inmaduras, T CD4+ y CD8+ virgen y memoria, B que migran a ganglio y presentadoras

de antígeno, NK frente a virus, dendríticas mieloides y plasmacitoides, progenitores de linaje mieloide y linfoide), se ha llevado a cabo un estudio detallado de la evolución o desarrollo de todas esas poblaciones y subpoblaciones celulares desde la semana 25 de gestación hasta la semana 42, que queda reflejado en el modelo presentado al final de esta discusión.

En este estudio realizado sobre la evolución del sistema inmune se obtuvo que los valores absolutos de linfocitos totales (CD45+) fueron más bajos en la semana 36 que en el resto de semanas de gestación del periodo estudiado, al igual que los valores absolutos en la misma semana gestacional de linfocitos T y linfocitos B, que también fueron más bajos respecto al resto de semanas gestacionales. Este hecho podría deberse a que se produciría un mayor reclutamiento de células en los ganglios, donde las células maduras esperan a la señal/estímulo que las haga salir a la periferia, al inicio del periodo *a término* en el que se da un mayor número de nacimientos. Sin embargo, en la semana 36 se mantuvieron las proporciones relativas de cada población celular, ya que los porcentajes de estas poblaciones linfocitarias fueron similares a los de otras semanas de gestación, quizás por la caída en los valores absolutos de todas las poblaciones. Fue interesante observar que las diferencias encontradas en células T totales (CD3+) entre las distintas semanas de gestación se debieron a las diferencias encontradas en las células T CD4+, tanto en valores absolutos como en porcentajes, y no a las encontradas en las células T CD8+ que presentaron un patrón distinto a lo largo del periodo estudiado (semana 25 a 42 de gestación).

Hay que destacar que la caída en los porcentajes de células T CD4+ fue significativa en las semanas 38 y 41, y también fue significativo el incremento de los porcentajes de células NK en esas mismas semanas. Estos datos sugieren una inversión

en el balance linfocitario entre estas dos poblaciones celulares, desde el periodo gestacional *pretérmino* al periodo *a término* [64]. Este incremento significativo de células NK en el periodo gestacional *a término* con una caída en el cociente CD4/NK con la edad podría describir una maduración gradual de la respuesta inmune citotóxica. Estos datos indican que probablemente los neonatos del periodo *a término*, preparados para salir del ambiente protector del útero, necesitan movilizar un mayor número de células a la periferia que puedan responder a posibles agentes infecciosos en el momento del nacimiento y en días posteriores. Esta podría ser una de las razones por las que los neonatos nacidos en semanas *pretérmino* (anteriores a la semana 37 de gestación) tengan una mayor susceptibilidad a padecer enfermedades infecciosas [65].

Por otro lado, los porcentajes de las células T CD8+ y de las células B se mantuvieron sin variaciones a lo largo de todo el periodo gestacional estudiado. Estos datos, junto con la inversa correlación observada entre los porcentajes de células T CD4+ y células NK y la asociación positiva entre edad gestacional y células NK, claramente indican que el balance linfocitario solamente ocurre entre las células T CD4+ y las células NK y que las células NK aumentan a lo largo de la gestación.

Cuando se estudió la evolución de las subpoblaciones inmaduras de células T CD3+, no se observaron diferencias significativas en el análisis realizado *semana a semana* en las células CD3+CD62L+ (células T con capacidad de migrar a ganglio), mientras que por grupos gestacionales (*muy pretérmino*, *pretérmino* y *a término*) se observaron los valores significativamente más bajos de esta subpoblación CD62L+ en el grupo *a término*. Estos datos reflejan que la cantidad de células T en sangre periférica con capacidad de migrar a ganglio disminuye al aumentar la edad gestacional, probablemente indicando que gran parte de células T inmaduras se encuentran ya en los

ganglios.

Por otro lado, el grupo de neonatos *muy pretérmino* tuvo valores más altos de células T inmaduras (CD3+CD1a+) que los otros dos grupos gestacionales. Estos datos junto con las diferencias observadas en el análisis realizado *semana a semana* en células T activadas (CD3+CD71+), proporcionan una idea del desarrollo lógico del sistema inmune del neonato y de la inmadurez del neonato *pretérmino*, que aún no dispone de un sistema celular capaz de hacer frente a posibles agentes infecciosos y, por tanto, tiene una tendencia mayor a contraer infecciones [65].

La molécula CD38 es un marcador de activación en adultos [66]. Sin embargo, en niños se expresa en los primeros estadios de maduración celular [67] y desaparece cuando la célula es madura; posteriormente, CD38 vuelve a expresarse en la superficie de la célula cuando ésta se activa por algún mecanismo externo. En esta Memoria se ha observado que en neonatos nacidos en semanas *muy pretérmino* y *pretérmino* el porcentaje de células T CD8+ inmaduras cuando se realizó el análisis *semana a semana* fue más alto que el porcentaje de esta subpoblación en los neonatos nacidos en semanas *a término*. Por esto, las diferencias encontradas en la subpoblación de células T CD8+CD38+ deben interpretarse como diferencias en la maduración de los linfocitos T CD8+ entre neonatos nacidos en distintas semanas de gestación, y no como diferencias en la activación. Sin embargo, se encontró el valor más alto en la semana 39 de gestación; en esta semana gestacional, en la que los nacimientos son más frecuentes, los neonatos deben nacer con una respuesta citotóxica adecuada para enfrentarse al medio extrauterino, por lo que necesitan de mayor número de células T CD8+ que se activen.

En diversos estudios se ha demostrado el alto porcentaje de células de fenotipo virgen (CD45RA+CD27+) que poseen los neonatos y el bajo porcentaje de células

memoria (CD45RO+), con respecto a niños y adultos [46, 47, 52]. En esta Memoria, se pone de manifiesto que no existen diferencias en estas subpoblaciones entre los tres grupos de neonatos (*muy pretérmino*, *pretérmino* y *a término*), independientemente de la edad gestacional. La población de células virgen se mantuvo en todas las semanas de gestación en unos valores por encima del 90% de la mediana, ya que, como se discutirá más adelante, el neonato posee una función tímica completa desde mucho antes del nacimiento [68, 69]. Por otra parte, las poblaciones de células memoria (CD45RO+) y células efectoras (CD27-CD45RA+), producidas a partir de la maduración de las células de memoria a corto plazo, se mantiene en unos valores inferiores al 0,2% de la mediana durante todo el periodo gestacional estudiado. Estos datos son los esperados, ya que indican que no ha habido contacto con antígenos que provoque la diferenciación de la célula virgen a célula memoria.

Los porcentajes de las subpoblaciones de células NK que expresaron los marcadores específicos Kir-NKAT2+ y Kir-p70+, aumentaron con la edad gestacional al igual que el *pool* de células NK (CD3-CD56+CD16+), produciendo el cambio en el balance linfocitario CD4/NK y corroborando que el sistema inmune se prepara, conforme avanzan las semanas de gestación, para hacer frente a cualquier patógeno fuera del ambiente protector del útero materno [64].

Aunque no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células B con capacidad de migrar a ganglio y funcional (CD19+CD62L+CD40+) en los neonatos nacidos en distintas semanas gestacionales, la expresión del marcador CD40 (MdIF CD19+CD40+), implicado en la *sinapsis inmunológica*, tuvo valores más bajos en neonatos que los descritos en niños y adultos. Además, la expresión de la subpoblación CD40+ varió de manera opuesta a las células T inmaduras durante todo el periodo

gestacional estudiado, lo que podría indicar la existencia de un balance entre todas las subpoblaciones linfocitarias, que deben “ponerse de acuerdo” para mantener el número y porcentajes correctos de linfocitos totales. Las células B con capacidad de presentación de antígeno (HLA-DR+) aumentaron con la edad gestacional, pero la población inmadura CD5+ disminuyó según aumentaba la edad gestacional, como otro indicio más de que el sistema inmune intenta tener todas sus “armas” disponibles por si debe enfrentarse con algún agente extraño en el momento del nacimiento.

El hecho de que la subpoblación de células dendríticas mieloides (BDCA-1+ ó CD1c+) se mantuvieran prácticamente igual en los neonatos de todas las semanas gestacionales estudiadas proporciona una idea de la inmadurez del *pool* monocítico, que no va a poder diferenciarse al siguiente estadio (la célula dendrítica) hasta que no existan las condiciones externas adecuadas.

Está ampliamente descrito que las células del cordón umbilical poseen un elevado número de progenitores hematopoyéticos, y por eso son, por ejemplo, candidatas para utilizarse en el trasplante de médula ósea [70]. Sin embargo, se conoce poco sobre la evolución de estas células progenitoras a lo largo de la gestación. Durante la realización de esta Memoria se ha comprobado que, como población inmadura, la células progenitoras hematopoyéticas han disminuido conforme se acercaba el periodo final de la gestación (periodo *a término*). Una vez más, en esta Memoria se observa que una subpoblación celular se “ajusta” durante el periodo gestacional para llegar a una proporción óptima en el momento del nacimiento.

Aunque previamente se ha descrito el desarrollo y evolución de las diferentes subpoblaciones celulares, es importante tener en cuenta que el desarrollo y la diferenciación del linfocito B se produce en paralelo a la diferenciación del linfocito T.

Los datos obtenidos en el estudio de las subpoblaciones de células B reflejan la incapacidad de los linfocitos B neonatales de producir inmunoglobulinas cuando se produce el contacto entre CD40 y su ligando en el linfocito T, CD40L. Además, estos datos apoyan la idea de que el neonato tiene una función B incompleta y que su inmunidad humoral se debe, en parte, a los anticuerpos maternos que atraviesan la placenta [71]. De hecho, los neonatos tienen cantidades muy bajas o indetectables de IgM, IgA e IgE. La IgG es la única clase de Ig que atraviesa la placenta de forma significativa, por lo que los valores de IgG encontrados en el suero del neonato son fundamentalmente de origen materno [23]. Un feto humano comienza a recibir cantidades significativas de IgG materna en la 12ª semana de gestación y estas cantidades aumentan de forma constante durante el periodo gestacional, alcanzando su máximo a partir de la semana 32, hasta que en el nacimiento la concentración sérica de IgG en el cordón umbilical es comparable o superior a la materna [72]. En esta Memoria, se ha detectado una cantidad significativamente más baja de IgG en los neonatos *muy pretérmino* (≤ 30 semanas) con respecto a los neonatos de los otros dos grupos gestacionales (*pretérmino* y *a término*). Aunque en otros estudios se han detectado pequeñas cantidades de IgA e IgM [73, 74], en esta Memoria, con la técnica utilizada, no se detectaron ni IgA ni IgM en el plasma del cordón umbilical de ninguno de los neonatos nacidos en las distintas semanas gestacionales. Esto puede ser debido a que al seleccionar neonatos sanos para realizar esta Memoria se condiciona el no hallar valores de Ig que sólo serían detectables bajo condiciones patológicas, o bien a que

ciertos estímulos antigénicos han sido capaces de atravesar la barrera placentaria para provocar una respuesta inmunológica.

Además de las Ig que se encuentran libres en el suero o plasma sanguíneos, existen otras Igs que se encuentran fijadas en la superficie del linfocito B, en donde actúan de receptores de Ag específicos. La variabilidad genética de las subfamilias de la cadena pesada (H) de estos receptores determina en gran parte la variabilidad del repertorio de células B capaces de reconocer un amplio espectro de Ag. En la literatura científica hay varios estudios que han intentado hacer una estimación del uso de los segmentos génicos V_H por las células B adultas, mediante diferentes técnicas, como hibridación *in situ* o PCR multiplex [39, 75], sentando las bases para la determinación de la expresión de las subfamilias del BCR en distintas poblaciones. Además, Zemlin *et al.* han descrito un patrón $V_{H3} > V_{H4} > V_{H1} > V_{H5} > V_{H2} > V_{H6}$ en neonatos *muy pretérmino* (semanas 25 a 28) y un patrón $V_{H3} > V_{H5} > V_{H1} > V_{H2} > V_{H4} > V_{H6}$ en neonatos *a término* (semanas 39 a 42) [76]. En el estudio realizado para esta Memoria, los resultados muestran una distribución en la expresión de las subfamilias V_H diferente: $V_{H5} > V_{H2} > V_{H3} > V_{H6} > V_{H4} > V_{H1}$, en los neonatos *pretérmino* y $V_{H2} > V_{H1} > V_{H6} > V_{H4} > V_{H3} > V_{H5}$, en los neonatos *a término*.

Algunos estudios en adultos han descrito la expansión clonal de alguna subfamilia V_H en relación con el desarrollo y curso de ciertas patologías: V_{H4} en la esclerosis múltiple [77] y V_{H3} en el *lupus* [78], aunque la subfamilia V_{H3} es también la más abundante en el repertorio de un individuo normal [79]. En este estudio se ha encontrado una expansión de clones de células B en el segmento génico que codifica para la subfamilia 3, desde el periodo *pretérmino* al periodo *a término*. Esto podría deberse a que las subfamilias V_{H3} están sobre-representadas en el genoma, por lo que la

maduración incrementa la disponibilidad de las subfamilias V_{H3} para expresarse. Por otro lado, la reducción del número de clones con el aumento de la edad gestacional que se ha observado en este estudio podría ser debida a la maduración del sistema inmune que, una vez más, intenta desarrollar todos los posibles receptores funcionales, que se reducen en número en las semanas próximas al nacimiento porque ya no son necesarios.

En resumen, en los neonatos incluidos en esta Memoria se ha observado una expresión disminuida de marcadores de coestimulación de la célula B, como CD40, y cantidades indetectables de algunas Igs. Estos datos junto con los valores de IgG menores en neonatos *pretérmino* que en neonatos *a término* y un patrón de expresión de las subfamilias del receptor de las células B diferente también en neonatos *pretérmino*, dan idea de la menor capacidad de montar una respuesta inmune humoral de los neonatos *pretérmino* con respecto a los neonatos *a término*.

El timo es el órgano linfoide donde los timocitos proliferan y se diferencian a células T maduras [80], pasando por una serie de estados fenotípicos discretos para formar un *pool* completo de células [81]. En humanos, el timo está completamente formado antes del nacimiento, es decir, la mayoría de las subpoblaciones de células están presentes en el nacimiento, incluidas las células más maduras [82]. Como se refleja en los resultados de esta Memoria, la mayoría de subpoblaciones de células T (CD3+, CD4+ y CD8+), tanto inmaduras/virgen como activadas, ya se expresan desde antes del nacimiento. Por esto, no se han observado diferencias significativas entre los tres grupos gestacionales en células T inmaduras con capacidad de migrar a ganglio, en células T virgen (tanto CD4+ como CD8+), e incluso en células T CD8+ inmaduras (CD8+CD38+), como se ha discutido anteriormente.

La función tímica se ha estudiado mediante la medida del cociente entre los β TRECs, generados en un estadio temprano de la generación de células T en el timo, y los sjTRECs, que se generan después de varios ciclos de proliferación [83]. Este cociente mide la “proliferación intratímica” que ocurre dentro del timo [84] y, por tanto, la capacidad del mismo para generar nuevos linfocitos. Esta medida se ha postulado como una técnica más exacta para el estudio de la función tímica [83], puesto que los sjTRECs presentan algunos problemas de interpretación, debido a que no se dividen con la célula y por tanto se produce un efecto “dilución” al dividirse la célula portadora del TREC. En esta Memoria, se ha observado que existe una asociación positiva entre los β TRECs y los sjTRECs, lo que demuestra que la proliferación de los timocitos $\text{TCR}\beta^+$ es proporcional a la de los timocitos $\text{TCR}\alpha\beta^+$.

La completa funcionalidad del timo se alcanza muy temprano en el periodo gestacional, antes de la semana 25 de gestación. Es interesante destacar que en esta Memoria no se han encontrado diferencias significativas en células T virgen ($\text{CD45RA}^+\text{CD27}^+$) entre los neonatos de diferentes edades gestacionales cuando se analizaron *semana a semana* de gestación o por grupos gestacionales, ni cuando se analizó la función tímica a través del cociente β TRECs/sjTRECs. Estos datos claramente indican que todos los neonatos estudiados tenían un timo funcional en el momento del nacimiento, independientemente de la edad gestacional.

Por otro lado, durante la proliferación y maduración del *pool* de células T, la IL-7 juega un papel fundamental, ya que proporciona una señal crucial para la supervivencia de los precursores tempranos de los timocitos [85, 86]. Además se ha probado el papel esencial de la IL-7 en el mantenimiento de la población T en modelos murinos [87] y la reconstitución de la población de células T en estados

inmunosuprimidos [88]. En esta Memoria se han encontrado valores más altos de IL-7 en los neonatos nacidos *a término*. Además, se observó que en las últimas semanas de gestación los valores de IL-7 plasmática tendían a disminuir cuando se incrementaban los valores de linfocitos T CD4+. Este hecho, aunque no fue estadísticamente significativo, sí tiene una gran importancia desde el punto de vista inmunológico, ya que se ha descrito la existencia de un mecanismo homeostático de la IL-7 con los linfocitos T CD4+, en patologías que conllevan una depleción de dichas células [89], como en procesos de trasplante de médula ósea, en pacientes oncológicos tras tratamiento quimioterápico y en la infección por VIH [90]. Los datos presentados en esta Memoria indican que este mecanismo homeostático puede darse en el neonato, ya que se encuentra en condiciones inmuno-competentes. Como se ha dicho, esta tendencia a la disminución de IL-7 y al incremento de células T CD4+ no fue significativa, por lo que si dicha tendencia fuera muy pronunciada se podría pensar en la existencia de una inmunodeficiencia congénita.

La TSLP utiliza el mismo receptor que la IL-7 y, en ausencia de la misma, ejerce una función muy similar [91]. Los resultados obtenidos en esta Memoria ponen de manifiesto que la TSLP podría tener también un mecanismo homeostático en relación con la IL-7 y el *pool* de linfocitos T CD4+, ya que en las muestras en las que se obtuvo un valor detectable de TSLP se encontró una asociación positiva y significativa entre los valores de TSLP y los porcentajes de células T CD4+.

El reconocimiento de los Ag por parte de las células T es esencial para la iniciación y regulación de una respuesta inmunitaria eficaz y este reconocimiento se lleva a cabo a través del receptor de células T (TCR), cuya variabilidad proporciona un amplio repertorio de células T capaces de reconocer a una gran cantidad de Ag extraños.

La hipótesis de que la función tímica es completa al nacimiento e independiente de la edad gestacional al nacer [92] se confirma con el hecho de encontrar pocas diferencias entre neonatos de distintas edades gestacionales en el repertorio de células T, a través del estudio del TCR. Pero, además, en otros estudios se ha mostrado que existe una fuerte correlación en el uso de subfamilias V β en neonatos y adultos sanos, en células T CD4+ y T CD8+ [93]. Las subfamilias que no experimentaron cambios en la clonalidad y que ésta fue elevada, fueron aquéllas subfamilias dianas de toxinas o superantígenos (como la subfamilia 3 para la enterotoxina B del estafilococo –SEB-, o la subfamilia 17 para el superantígeno de la artritis por micoplasma -MAS-) [94], por lo que deben expresarse en gran cantidad y prepararse para un eventual contacto con el patógeno. Las subfamilias que no se expresan en ningún caso, normalmente tienen una representación muy baja en células T, como la subfamilia 23 que se expresan en algunas líneas celulares que se utilizan para expandir el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Los tres patrones observados cuando se compararon neonatos de diferente edad gestacional, atienden al “ajuste” que el sistema inmune debe hacer al acercarse el momento del nacimiento. Es decir, al nacer el neonato se encuentra en un medio no estéril donde se deberá enfrentar a múltiples antígenos; por eso, primero tendrá que reducir la expresión de algunos receptores que quizá está sobreexpresando o, por el contrario, deberá aumentar el número de clones de un determinado receptor que reconozca un determinado antígeno.

El conjunto de datos generados en esta Memoria acerca del papel del timo en neonatos sanos, pone de manifiesto que en estos niños la función tímica es óptima, independientemente de la edad gestacional. No se dan diferencias entre las distintas

edades gestacionales, porque el hecho de que no exista patología (son neonatos sanos nacidos de madres también sanas) hace que tampoco existan diferencias.

Además del estudio fenotípico de poblaciones y subpoblaciones linfocitarias es necesario estudiar la funcionalidad de las células neonatales y las diferencias existentes entre los neonatos nacidos en distintas semanas de gestación. El estudio funcional de células T, es decir, el ensayo de proliferación a diferentes estímulos, indica que no existen diferencias significativas en la capacidad de activación de los linfocitos T entre neonatos nacidos en diferentes semanas de gestación. La estimulación con mitógenos (PHA, PWM) o con anti-TCR (anti-CD3+anti-CD28), indujo un aumento sustancial de la proliferación de las CMSCUs en todos los neonatos, independientemente de la edad gestacional. Sin embargo, en la semana 40 se observó un aumento mayor aunque no significativo, lo que posiblemente sugiera que la maduración de la función de las células T comience en este periodo.

La supervivencia del feto depende del desarrollo de una respuesta inmune materna Th2 y una inhibición de la respuesta Th1 [95]. La maduración de células T neonatales inicialmente también está dirigida hacia un perfil Th2 [96], incluso en los neonatos nacidos en un periodo *pretérmino* [97], aunque la respuesta Th1 comienza a desarrollarse a los pocos días después del nacimiento [96, 97]. En esta Memoria se estudiaron 11 citocinas diferentes en el plasma de los neonatos incluidos en el estudio, con el objetivo de describir con el mayor detalle el balance Th1/Th2 de dichos neonatos. Los resultados obtenidos indican que hay una falta de estimulación antigénica a lo largo del desarrollo neonatal, ya que no se encontraron valores detectables de las citocinas IL-1 β , TNF- β , IL-4 e IL-10, y del resto de citocinas estudiadas, tanto Th1 como Th2, sólo se encontraron valores detectables en 18 neonatos, indicando que el sistema inmune del

neonato no produce ningún tipo de mediador soluble de los que se secretan en un individuo normal cuando ante un estímulo o agente infeccioso se monta una respuesta inmunitaria. Además, el hecho de haber seleccionado neonatos sanos condiciona que no se observen valores detectables de algunas citocinas que sólo se detectarían en condiciones de patología, como las citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IFN γ , IL-6).

En otros estudios se ha propuesto que la inmadurez del sistema inmunológico del recién nacido no es debida sólo a defectos en el brazo T, sino que existen fallos en la capacidad de presentación antigénica de los monocitos/macrófagos, así como en la cantidad de moléculas coestimuladoras, para iniciar el proceso de “sinapsis inmunológica” (revisados en ref. [98]).

Los monocitos y macrófagos pertenecen a la primera línea de defensa del sistema inmune. Se distribuyen ampliamente por todos los tejidos y participan tanto en la respuesta inmune específica como en la no específica, frente a infecciones bacterianas, virales, fúngicas, etc. Los monocitos humanos expresan tres clases distintas de receptores FccR: FccRI/CD64, FccRII/CD32, and FccRIII/CD16 [99]. Estos receptores son muy efectivos en la unión, internalización y destrucción de partículas opsonizadas. Los monocitos también expresan niveles altos de moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), como HLA-DR, las cuales juegan un papel crucial en la presentación del antígeno a las células T CD4+ [100].

En este proceso, la molécula HLA-DR es una importante conexión entre la respuesta inmunitaria innata y la adquirida [101, 102]. Se ha descrito que una baja expresión de HLA-DR en monocitos neonatales, con respecto a los de adultos, contribuye a una defensa del neonato reducida [103-106]. En esta Memoria se ha

observado que los monocitos de los neonatos nacidos en semanas *muy pretérmino* (semanas 25 a 30 de gestación), tuvieron una expresión de HLA-DR significativamente más baja que los neonatos *pretérmino* y *a término*, tanto en ausencia de estímulo como cuando se estimularon con LPS, indicando que los neonatos *muy pretérmino* tienen una función de presentación de antígeno incompleta [107, 108]. Además, cuando se estimularon los monocitos con LPS+IFN γ , los valores de HLA-DR en el grupo *muy pretérmino* se incrementaron, lo que está de acuerdo con el hecho de que el IFN γ aumenta la expresión de HLA-DR [109].

La expresión de CD40 no varió significativamente con la edad gestacional y fue independiente del estímulo utilizado, porque no se incrementó con LPS ni con LPS+IFN γ . Esta falta de activación en respuesta a LPS [110] así como a IFN γ [111], podría explicar la baja capacidad de los monocitos neonatales para interaccionar con las células T e inducir una presentación de antígeno efectiva.

La familia B7 consta de al menos 2 moléculas: CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2). Ambas moléculas se unen a ligandos que se encuentran en las células T, CD28 y CTLA-4 (CD152), con diferente afinidad [112]. CD80 no se expresa constitutivamente en macrófagos, mientras que CD86 se expresa de forma constitutiva en macrófagos de adultos sanos [113, 114]. Los resultados obtenidos en esta Memoria muestran que la expresión de CD80 aumentó y la de CD86 en los monocitos de los neonatos disminuyó con el estímulo, pero no variaron significativamente con la edad gestacional. Sin embargo, la expresión de CD80 en los neonatos *muy pretérmino* fue más baja que en los otros dos grupos de neonatos cuando se estimuló con LPS; pero, además, no se observó un aumento significativo en la expresión de CD80 cuando se estimularon los monocitos con LPS+IFN γ . Estos datos corroboran lo anteriormente descrito por otros autores que

describen una desregulación de la capacidad coestimuladora de los monocitos de sangre de cordón [115]. Por otro lado, el IFN γ es normalmente sintetizado por los linfocitos Th1 y genera una ayuda coestimuladora de tipo monocito/macrófago que hace que se exprese o aumente la expresión de los receptores de la familia B7 (CD80 y CD86) [116]. Sin embargo, los monocitos/macrófagos neonatales exhiben una falta de respuesta a IFN γ [117, 118], hecho que corroboran los resultados obtenidos en esta Memoria, donde el efecto sinérgico del IFN γ con el LPS en la inducción de la expresión de estas moléculas no fue apreciable.

Además de la activación de células T, la expresión de moléculas de la familia B7 tiene un efecto en la producción de citocinas [119]. Se ha descrito previamente que la expresión de CD80 correlaciona con el desarrollo de células Th1 y la expresión de CD86 favorece la generación de células Th2 [119]. La capacidad de inducir una respuesta Th1, medida como la producción de la citocina IL-12p 40, fue de la misma magnitud en los monocitos de neonatos *muy pretérmino* respecto a la generada por los monocitos de neonatos *pretérmino* y *a término*. Este hecho junto con el aumento en la expresión de CD80 en neonatos *muy pretérmino* al estimular con LPS o LPS+IFN γ , alcanzando los mismos valores que los neonatos de los otros dos grupos estudiados, apoyan la idea de que los neonatos *muy pretérmino* ante la ausencia de estímulo se encuentran menos preparados para montar una respuesta inmune, pero cuando los monocitos son estimulados pueden llegar a alcanzar una respuesta similar en magnitud a la de los neonatos *pretérmino* y *a término*.

Las moléculas de adhesión, como CD11c, CD54 (o ICAM-1) y CD16, son importantes para la fijación del monocito/macrófago al lugar del daño, que posteriormente enviará las señales adecuadas para reclutar otros tipos celulares en dicho

sitio. En esta Memoria, no se observaron diferencias en el porcentaje de células que expresan marcadores de adhesión entre neonatos nacidos en diferentes semanas gestacionales. Sin embargo, sí hubo diferencias en el número de moléculas del receptor CD11c, que fue más bajo en el grupo *muy pretérmino*, como se ha descrito previamente [120]. Además, los neonatos del grupo *muy pretérmino* no produjeron los mismos valores de quimiocinas, como TGF α , que ayuda al reclutamiento antes mencionado, que los neonatos *pretérmino* y *a término*. Es decir, que aunque las células fagocíticas pueden adherirse al lugar donde se está produciendo la infección, no hay una señal suficiente por parte de las quimiocinas que consigan hacerlas llegar a dicho lugar.

Los resultados de esta Memoria muestran que los marcadores celulares de activación, tanto temprana (CD69) como media o tardía (CD25), se expresaron en mayor cantidad en los neonatos *muy pretérmino* que en los *pretérmino* y *a término*, sobre todo cuando no se habían expuesto a ningún estímulo. Estos datos fueron más evidentes cuando se analizó la expresión del marcador CD69 en ausencia de estímulo. Este hecho, unido a los valores más altos de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8, encontrados en el grupo de neonatos *muy pretérmino* respecto a los otros dos grupos cuando los monocitos no habían sido estimulados, podría favorecer un ambiente más propenso a padecer infecciones ante la invasión de cualquier patógeno por una respuesta inflamatoria incontrolada observada en los neonatos *muy pretérmino* [121]. Pero, además, los resultados obtenidos en esta Memoria mostraron que los monocitos de los neonatos *muy pretérmino* tuvieron unos valores más altos de expresión de los receptores CD14 y TLR4 a nivel molecular que, si se produjera una posible infección bacteriana, iniciarían la transcripción de genes de citocinas proinflamatorias [122]. Estos últimos resultados, podrían explicar el hecho de que los neonatos nacidos

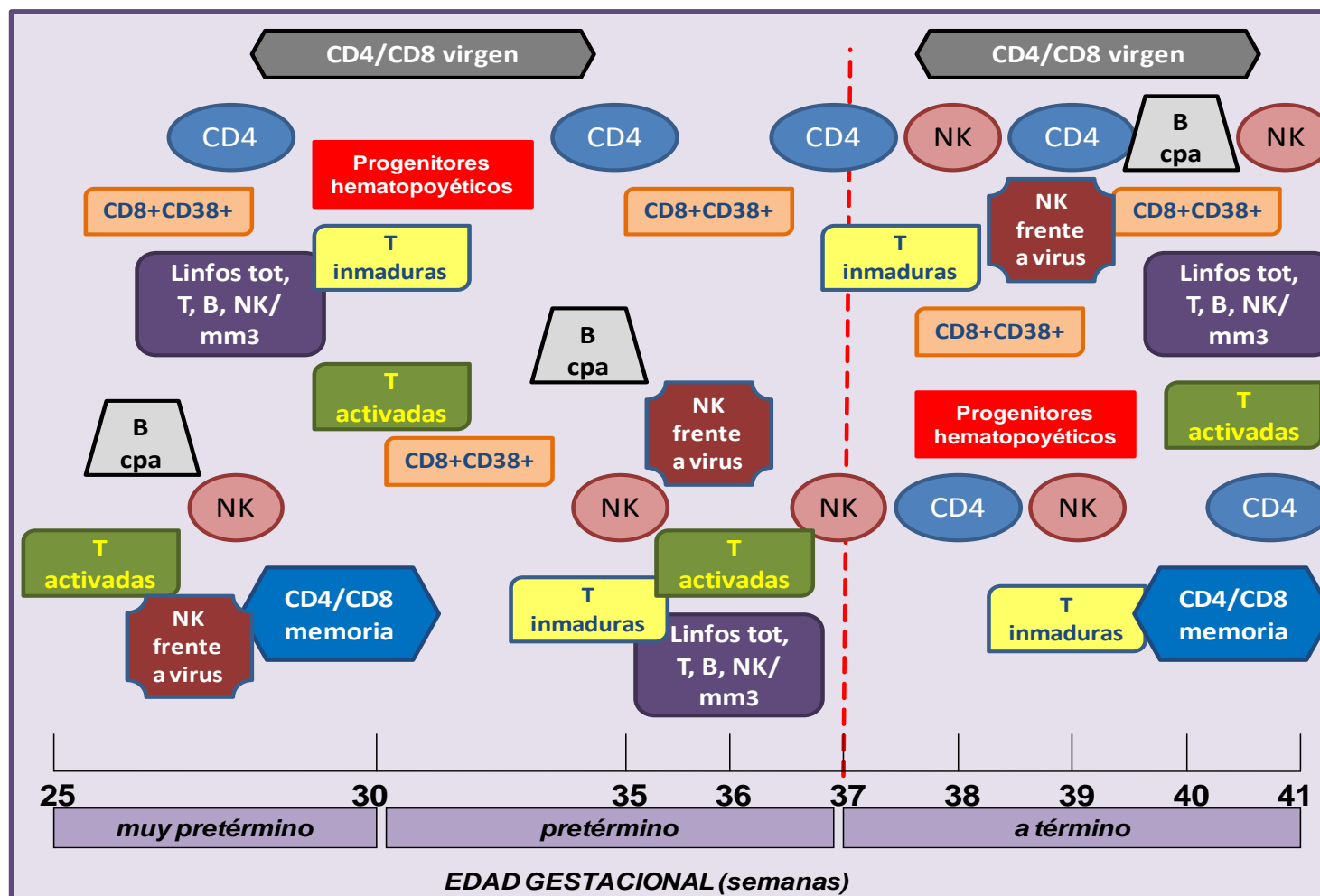
en semanas gestacionales muy prematuras son más susceptibles a infecciones bacterianas, como sepsis neonatal. Otros investigadores han postulado que la expresión de los receptores CD14 y TLR4 aumentan con la edad gestacional [123, 124]. Sin embargo, en esos estudios el porcentaje de células CD14+ o TLR4+ se midió por citometría de flujo, estimulando las células directamente en sangre total y con un tiempo de estimulación mucho menor. Para esta Memoria se aislaron los monocitos a través de su receptor CD14+ y se estimularon en cultivo durante 40 horas, midiéndose la cantidad de expresión de los receptores por PCR cuantitativa a tiempo real, técnica que es más sensible, por lo que ambos tipos de resultados y razonamientos no se excluyen entre sí, pudiendo explicar distintos hechos. Por otro lado, tampoco la expresión del ARN mensajero de CD14 se vio favorecida por la adición de IFN γ al cultivo.

En resumen, los monocitos de neonatos *muy pretérmino* tienen una capacidad de presentación de antígeno y coestimuladora disminuida con respecto a los neonatos *pretérmino* y *a término*. Estos defectos hacen que los neonatos *muy pretérmino* no sean capaces de llevar a cabo el proceso completo de “sinapsis inmunológica” y, por tanto, las células T no sean capaces de reconocer al patógeno. Además, una activación basal en los monocitos de los neonatos *muy pretérmino* más alta que en los otros dos grupos de neonatos, observada tanto a nivel celular como molecular, podría explicar la mayor susceptibilidad de los neonatos *muy pretérmino* a padecer infecciones bacterianas, debido a un microambiente proinflamatorio incontrolado.

Teniendo en cuenta todo lo mencionado, se podría decir que el sistema inmune neonatal es “inmaduro” en el sentido de que es “inexperto”; es decir, que aún teniendo todas las herramientas a su alcance, todavía no ha tenido ocasión de utilizarlas, pero esto no significa que no sepa hacerlo. De tal forma, que en neonatos con algún parámetro

inmunológico que difiera de los descritos en esta Memoria, de acuerdo a su edad gestacional, se tendrá que sospechar de la existencia de algún defecto inmunológico.

Figura 6.1. Composición y evolución de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias a lo largo de todo el periodo gestacional estudiado.



CONCLUSIONES

1. El riesgo de parto prematuro o muy prematuro se incrementa cuando no existe un control adecuado de la gestación y/o cuando las madres toman fármacos ajenos a la historia natural del parto, por alguna patología asociada o no a la gestación.
2. Se han definido por primera vez valores de referencia de las poblaciones y subpoblaciones celulares más importantes del sistema inmune (T, B, NK, mieloides y plasmacitoides y progenitores hematopoyéticos), *semana a semana* de gestación y por grupos gestacionales (*muy pretérmino* o ≤ 30 semanas de gestación, *pretérmino* o 31-36 semanas y *a término* o ≥ 37 semanas de gestación).
3. En el conjunto de poblaciones celulares T, B y NK, existe una inversión en el balance linfocitario entre las células T CD4+ y las células NK, del periodo *pretérmino* al periodo *a término*.
4. Las células T CD3+ y T CD8+ con fenotipo inmaduro tienen una producción intermitente y variable a lo largo del último trimestre de la gestación; mientras que no existen diferencias significativas en las poblaciones virgen, efectora y memoria activada, tanto en células T CD4+ como en células T CD8+, desde el periodo *pretérmino* al periodo *a término*.
5. Las subpoblaciones de células NK, así como las células B con fenotipo de células presentadoras de antígeno, aumentan progresivamente con la edad gestacional. Sin embargo la subpoblación de células B CD5+, inmadura, y las subpoblaciones de células progenitoras, disminuyen conforme se avanza en la gestación.

6. Se ha observado claramente que los neonatos *pretérmino* tienen una menor capacidad de montar una respuesta inmune humoral que los neonatos *a término*. Esta menor respuesta es debido a la expresión disminuida de marcadores de coestimulación de la célula B, como el CD40, la no cuantificación de IgM e IgA y valores de IgG mas bajos en neonatos *pretérmino* que en neonatos *a término*. Así como un patrón de expresión de las subfamilias del receptor de las células B diferente también en neonatos *pretérmino*.
7. La función tímica en neonatos sanos es óptima y, más importante, es independiente de la edad gestacional, ya que a lo largo de esta Memoria no se han observan diferencias ni en la proporción de células T virgen que se encuentran en periferia, ni en la proliferación intratímica entre los neonatos estudiados a distintas semanas gestacionales. Además, hemos observado tres patrones de expresión del repertorio de células T diferentes desde el periodo *muy pretérmino* al periodo *a término*.
8. Existe un mecanismo homeostático de compensación entre la IL-7 y las células T CD4+ en las últimas semanas del periodo *a término*, que aunque estadísticamente no es significativo sí puede tener una significación biológica ya que este mecanismo se ha observado en patologías que llevan asociada una depleción de células T CD4+. Sin embargo, existe una correlación positiva entre la TSLP y el porcentaje de células T CD4+.
9. La estimulación con mitógenos (PHA, PWM) o con anti-TCR (anti-CD3+anti-CD28), induce un aumento de la proliferación de las CMSCUs en

neonatos, independientemente de la edad gestacional, indicando que no existen diferencias significativas en la capacidad de proliferación de las CMSCUs entre neonatos nacidos en diferentes semanas de gestación.

10. Los resultados obtenidos en el perfil de citocinas Th1/Th2 indican que hay una falta de estimulación antigénica a lo largo del desarrollo neonatal, ya que el sistema inmune del neonato no produce ningún tipo de mediador soluble de los que secreta un individuo adulto cuando, ante un estímulo o agente infeccioso, se monta una respuesta inmunitaria.
11. Los monocitos de neonatos *muy pretérmino* tienen una capacidad de presentación de antígeno y coestimuladora disminuida con respecto a los neonatos *pretérmino* y *a término*. Estos defectos pueden hacer que los neonatos *muy pretérmino* no sean capaces de llevar a cabo el proceso completo de “sinapsis inmunológica” y, por tanto, las células T no puedan reconocer al patógeno.
12. Los monocitos de los neonatos *muy pretérmino* tienen una activación basal más alta que los de neonatos *pretérmino* y *a término*, tanto a nivel celular como molecular. Esto explica la mayor susceptibilidad de los neonatos *muy pretérmino* a padecer infecciones bacterianas, debido a la existencia de un microambiente proinflamatorio incontrolado.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Haynes, B. and S. Denning, *Lymphopoiesis.*, in *Molecular basis of blood diseases.*, G. Stamatoyannopoulos, et al., Editors. 1994, WB Saunders: Philadelphia.
2. Haynes, B., K. Singer, S. Denning, and M. Martin, *Analysis of expression of CD2, CD3 and T cell antigen receptor molecules during early human fetal thymic development.* J Immunol, 1988. **141**: p. 3776-3784.
3. Haynes, B., S. Denning, K. Singer, and J. Kurtzberg, *Ontogeny of T cell precursors: a model for the initial stages of human T cell development.* Immunol Today, 1989. **10**: p. 87.
4. Campana, D., G. Jannossy, E. Coustan-Smith, and e. al., *The expression of T cell receptor-associated proteins during T cell ontogeny in man.* J Immunol, 1989. **142**: p. 57-66.
5. von Hoegen, P., S. Sarin, and J. Hrowka, *Deficiency in T cell responses of human fetal lymph node cells: a lack of accessory molecules.* Immunol Cell Biol, 1995. **73**: p. 353-361.
6. Jameson, S. and M. Bevan, *T-cell selection.* Curr Opin Immunol, 1998. **10**: p. 214-219.
7. Sebzda, E., S. Mariathasan, T. Ohteki, R. Jones, M. Bachmann, and P. Ohashi, *Selection of the T cell repertoire.* Ann Rev Immunol, 1999. **17**: p. 829-874.
8. Mosmann, T., H. Cherwinski, M. Bond, M. Giedlin, and R. Coffman, *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.* J Immunol, 1986. **136**: p. 2348-2357.
9. Douek, D.C., R.D. McFarland, P.H. Keiser, E.A. Gage, J.M. Massey, B.F. Haynes, M.A. Polis, A.T. Haase, M.B. Feinberg, J.L. Sullivan, B.D. Jamieson, J.A. Zack, L.J. Picker, and R.A. Koup, *Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection.* Nature, 1998. **396**(6712): p. 690-5.
10. Tarlinton, D., *B-cell differentiation in the bone marrow and the periphery.* Immunol Rev, 1994. **137**: p. 203-209.
11. Boffil, M., G. Jannossy, M. Jannossa, and e. al., *Human B cell development.II. Subpopulations in the human fetus.* J Immunol, 1985. **134**: p. 1531-1538.
12. Palfi, M. and A. Selbing, *Placental transport of maternal immunoglobulin G.* Am J Reprod Immunol, 1998. **39**: p. 24-26.

13. Rai, R., G. Sacks, and G. Trew, *Natural killer cells and reproductive failure - theory, practice and prejudice*. Hum Reprod, 2005. **20**: p. 1123-1126.
14. Forestier, F., F. Daffos, N. Catherine, M. Renard, and J. Andreux, *Developmental hematopoiesis in normal human fetal blood*. Blood, 1991. **77**: p. 2360-2363.
15. Jannossy, G., M. Boffil, L. Poulter, and e. al., *Separate ontogeny of two macrophage-like accessory cell populations in the human fetus*. J Immunol, 1986. **136**: p. 4354-4361.
16. Foster, C., K. Holbrook, and A. Farr, *Ontogeny of Langerhans cells in human embryonic and fetal skin: expression of HLA-DR and OKT-6 determinants*. J Invest Dermatol, 1986. **86**: p. 1342-1348.
17. Kapur, R., M. Yoder, and R. Polin, *Neonatal-Perinatal Medicine: Diseases of the Fetus and Infant*. 2005, Mosby: St. Louis, MO.
18. Hannet, I., F. Erkeller-Yuksel, P. Lydyard, V. Deneys, and M. De Bruyere, *Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations*. Immunol Today, 1992. **13**: p. 215-218.
19. Osugi, Y., J. Hara, H. Kurahashi, N. Sakata, M. Inoue, K. Yumura-Yagi, S. Kawa-Ha, S. Okada, and A. Tawa, *Age-related changes in surface antigens on peripheral lymphocytes of healthy children*. Clin Exp Immunol, 1995. **100**: p. 543-548.
20. Rowe, J., C. Macaubas, T. Monger, and e. al., *Vaccine antigen-specific responses in human infants are initially Th2 polarised*.
21. Bofill, M., G. Janossy, M. Janossa, G.D. Burford, G.J. Seymour, P. Wernet, and E. Kelemen, *Human B cell development. II. Subpopulations in the human fetus*. J Immunol, 1985. **134**(3): p. 1531-8.
22. Tucci, A., A. Mouzaki, H. James, J. Bonnefoy, and R. Zubler, *Are cord blood B cells functionally mature?* Clin Exp Immunol, 1991. **84**: p. 389-394.
23. Holt, P.G. and A.C. Jones, *The development of the immune system during pregnancy and early life*. Allergy, 2000. **55**: p. 688-697.
24. Klein, R., T. Fischer, S. Gard, M. Biberstein, K. Rich, and E. Stiehm, *Decreased mononuclear and polymorphonuclear chemotaxis in human newborns, infants and young children*. Pediatrics, 1977. **60**: p. 467-472.

25. Li, Y., R. Ohls, and R. Christensen, *Effects of recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor on the capacity of mononuclear cells from preterm infants to generate interleukine-6 and granulocyte colony-stimulating factor*. Int J Pediatr Hematol Oncol, 1996. **3**: p. 63-66.
26. Peña Martínez, J., *Inmunología*. 2003.
27. Lewis, D. and C. Wilson, *Developmental immunology and role of host defences in neonatal susceptibility to infection.*, in *Infectious diseases of the fetus and newborn infant.*, J. Remington and J. Klein, Editors. 1995: Saunders, Philadelphia. p. 20-98.
28. Husband, A. and M. Gleeson, *Ontogeny of mucosal immunity-environmental and behavioral influences*. Brain, 1996(10): p. 188-204.
29. Gans, H., A. Arvin, J. Galinus, L. Logan, R. DeHovitz, and Y. Maldonado, *Deficiency of the humoral immune response to measles vaccine in infants immunized at age 6 months*. JAMA, 1998(280): p. 527-532.
30. Hassett, D., J. Zhang, and J. Whitton, *Neonatal DNA immunization with a plasmid encoding an internal viral protein is effective in the presence of maternal antibodies and protects against subsequent viral challenge*. J Virol, 1997(71): p. 7881-7888.
31. Comans-Bitter, W., R. de Groot, R. van den Beend, H. Neijens, W. Hop, K. Groeneveld, H. Hooijkaas, and J. van Dongen, *Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations*. J Pediatr, 1997(130): p. 388-393.
32. Berrington, J., D. Barge, A. Fenton, A. Cant, and G. Spickett, *Lymphocyte subsets in term and significantly preterm UK infants in the first year of life analysed by single platform flow cytometry*. Clin Exp Immunol., 2005. **140**((2)): p. 289-92.
33. Erkeller-Yuksel, F., V. Deneys, B. Yuksel, I. Hannet, F. Hulstaert, and C. Hamilton, *Age-related changes in human cord blood lymphocytes in childhood*. J Pediatr, 1991(120): p. 216-222.
34. Aldhous, M., G. Raab, K. Doherty, J. Mok, A. Bird, and K. Froebel, *Age-related ranges of memory, activation, and cytotoxic markers on CD4 and CD8 cells in children*. J Clin Immunol, 1994(14): p. 289-298.

35. Buckley, R., *Primary immunodeficiency diseases due to defects in lymphocytes*. N Engl J Med, (343): p. 1313-24.
36. Shankaran S, F.A., Wright LL, Stevenson DK, Donovan EF, Ehrenkranz RA, Langer JC, Korones SB, Stoll BJ, Tyson JE, Bauer CR, Lemons JA, Oh W, Papile LA, *Risk factors for early death among extremely low-birth-weight infants*. Am J Obstet Gynecol, 2002. **186**: p. 796-802.
37. Hindmarsh, G., M. O'Callaghan, H. Mohay, and Y. Rogers, *Gender differences in cognitive abilities at 2 years in ELBW infants. Extremely low birth weight*. Early Hum Dev, 2000. **60**: p. 115-122.
38. Kotiranta-Ainamo, A., M. Apajasalo, M. Pohjavuori, N. Rautonen, and J. Rautonen, *Mononuclear cell subpopulations in preterm and full-term neonates: independent effects of gestational age, neonatal infection, maternal pre-eclampsia, maternal betamethason therapy, and mode of delivery*. Clin Exp Immunol, 1999. **115**(2): p. 309-14.
39. Feuchtenberger, M., H.P. Tony, A.S. Rouziere, A. Jacobi, T. Dorner, C. Kneitz, and P. Starostik, *Semiquantitative and qualitative assessment of B-lymphocyte V H repertoire by a fluorescent multiplex PCR*. J Immunol Methods, 2003. **276**(1-2): p. 121-7.
40. Genevee, C., A. Diu, J. Nierat, A. Caignard, P.Y. Dietrich, L. Ferradini, S. Roman-Roman, F. Triebel, and T. Hercend, *An experimentally validated panel of subfamily-specific oligonucleotide primers (V alpha 1-w29/V beta 1-w24) for the study of human T cell receptor variable V gene segment usage by polymerase chain reaction*. Eur J Immunol, 1992. **22**(5): p. 1261-9.
41. Pilch, H., H. Hohn, K. Freitag, C. Neukirch, A. Necker, P. Haddad, B. Tanner, P.G. Knapstein, and M.J. Maeurer, *Improved assessment of T-cell receptor (TCR) VB repertoire in clinical specimens: combination of TCR-CDR3 spectratyping with flow cytometry-based TCR VB frequency analysis*. Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(2): p. 257-66.
42. Stoll, B.J., T. Gordon, S.B. Korones, S. Shankaran, J.E. Tyson, C.R. Bauer, A.A. Fanaroff, J.A. Lemons, E.F. Donovan, W. Oh, D.K. Stevenson, R.A. Ehrenkranz, L.A. Papile, J. Verter, and L.L. Wright, *Early-onset sepsis in very low birth weight neonates: a report from the National Institute of Child Health*

- and Human Development Neonatal Research Network*. J Pediatr, 1996. **129**(1): p. 72-80.
43. Jones, A.C., E.A. Miles, J.O. Warner, B.M. Colwell, T.N. Bryant, and J.A. Warner, *Fetal peripheral blood mononuclear cell proliferative responses to mitogenic and allergenic stimuli during gestation*. Pediatr Allergy Immunol, 1996. **7**(3): p. 109-16.
44. Splawski, J.B., D.F. Jelinek, and P.E. Lipsky, *Delineation of the functional capacity of human neonatal lymphocytes*. J Clin Invest, 1991. **87**(2): p. 545-53.
45. Wilson, C.B., J. Westall, L. Johnston, D.B. Lewis, S.K. Dower, and A.R. Alpert, *Decreased production of interferon-gamma by human neonatal cells. Intrinsic and regulatory deficiencies*. J Clin Invest, 1986. **77**(3): p. 860-7.
46. Comans-Bitter, W.M., R. de Groot, R. van den Beemd, H.J. Neijens, W.C. Hop, K. Groeneveld, H. Hooijkaas, and J.J. van Dongen, *Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations*. J Pediatr, 1997. **130**(3): p. 388-93.
47. Berrington, J.E., D. Barge, A.C. Fenton, A.J. Cant, and G.P. Spickett, *Lymphocyte subsets in term and significantly preterm UK infants in the first year of life analysed by single platform flow cytometry*. Clin Exp Immunol, 2005. **140**(2): p. 289-92.
48. Gasparoni, A., R. Maccario, G. Chirico, C. Belloni, G. Mingrat, D. De Amici, M.R. Bonora, and G. Rondini, *Neonatal B lymphocyte subpopulations and method of delivery*. Biol Neonate, 1992. **61**(3): p. 137-41.
49. Juretic, E., B. Uzarevic, M. Petroveck, and A. Juretic, *Two-color flow cytometric analysis of preterm and term newborn lymphocytes*. Immunobiology, 2000. **202**(5): p. 421-8.
50. Kavelaars, A., G. van der Pompe, J.M. Bakker, P.M. van Hasselt, B. Cats, G.H. Visser, and C.J. Heijnen, *Altered immune function in human newborns after prenatal administration of betamethasone: enhanced natural killer cell activity and decreased T cell proliferation in cord blood*. Pediatr Res, 1999. **45**(3): p. 306-12.

51. Aygun, A., A. Kurt, A. Godekmerdan, A. Kurt, S. Akarsu, M. Gurgoze, and E. Yilmaz, *Neonates with culture proven sepsis have lower amounts and percentage of CD45RA+ T cells*. Inflammation, 2008. **31**(4): p. 222-.
52. Erkeller-Yuksel, F.M., V. Deneys, B. Yuksel, I. Hannel, F. Hulstaert, C. Hamilton, H. Mackinnon, L.T. Stokes, V. Munhyeshuli, F. Vanlangendonck, and et al., *Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations*. J Pediatr, 1992. **120**(2 Pt 1): p. 216-22.
53. Aldhous, M.C., G.M. Raab, K.V. Doherty, J.Y. Mok, A.G. Bird, and K.S. Froebel, *Age-related ranges of memory, activation, and cytotoxic markers on CD4 and CD8 cells in children*. J Clin Immunol, 1994. **14**(5): p. 289-98.
54. Beck, R. and P. Lam-Po-Tang, *Comparison of cord blood and adult blood lymphocyte normal ranges: a possible explanation for decreased severity of graft versus host disease after cord blood transplantation*. Immunol Cell Biol, 1994(72): p. 440-444.
55. Heldrup, J., O. Kalm, and K. Prellner, *Blood T and B lymphocyte subpopulations in healthy infants and children*. Acta Paediatrica, 1992(81): p. 125-132.
56. Mitchie, C. and D. Harvey, *Can expression of CD45RO+, a T-cell surface molecule, be used to detect congenital infection?* Lancet, 1994. **343**: p. 1259-1260.
57. Tezuka, T., K. Sugita, N. Mizobe, K. Goi, N. Miyamoto, M. Nakamura, K. Kagami, T. Yokoyama, and S. Nakazawa, *Transient decrease in CD45RO expression on T lymphocytes in infected newborns*. Pediatr Res, 1998. **43**: p. 283-290.
58. Zhang, X., E. Deriaud, X. Jiao, D. Braun, C. Leclerc, and R. Lo-Man, *Type I interferons protect neonates from acute inflammation through interleukin 10-producing B cells*. J Exp Med, 2007. **204**(5): p. 1107-1118.
59. O'Connor, G., O. Hart, and C. Gardiner, *Putting the natural killer cell in its place*. Immunology, 2005. **117**: p. 1-10.
60. Watzl, C., *The NKG2D receptor and its ligands - recognition beyond the "missing self"?* Microbes and Infection, 2003. **1**(5): p. 31-37.
61. Bakker, A., J. Phillips, C. Figdor, and L. Lanier, *Killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules regulate lysis of melanoma cells mediated by NK*

- cells, gamma delta T cells, and antigen-specific CTL.* J Immunol, 1998. **160**(11): p. 5239-5245.
62. Darmochwal-Kolarz, D., D.J. Rolinski, J. Tabarkiewicz, B. Lesczynska-Gorzela, J. Buczkowski, K. Wojas, and J. Oleszczuk, *Myeloid and lymphoid dendritic cells in normal pregnancy and pre-eclampsia.* Clin Exp Immunol, 2003. **132**: p. 339-344.
63. Dick, J., *Stem cell concepts renew cancer research.* Blood, 2008. **112**: p. 4793-4807.
64. Perez, A., M.D. Gurbindo, S. Resino, A. Aguaron, and M.A. Munoz-Fernandez, *NK cell increase in neonates from the preterm to the full-term period of gestation.* Neonatology, 2007. **92**(3): p. 158-63.
65. Wilson, C., *Immunologic basis for increased susceptibility of the neonate to infection.* J Pediatr, 1986(108): p. 1-12.
66. Giorgi, J.V., L.E. Hultin, J.A. McKeating, T.D. Johnson, B. Owens, L.P. Jacobson, R. Shih, J. Lewis, D.J. Wiley, J.P. Phair, S.M. Wolinsky, and R. Detels, *Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage.* J Infect Dis, 1999. **179**(4): p. 859-70.
67. Jackson, D.G. and J.I. Bell, *Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation.* J Immunol, 1990. **144**(7): p. 2811-5.
68. Steinmann, G.G., *Changes in the human thymus during aging.* Curr Top Pathol, 1986. **75**: p. 43-88.
69. Mackall, C. and R. Gress, *Thymic aging and T-cell regeneration.* Immunol Rev, 1997. **160**: p. 91-102.
70. Wagner, J., *Umbilical cord blood transplantation: overview of the clinical experience.* Blood Cells, 1994. **20**: p. 227-234.
71. Splawski, J.B. and P.E. Lipsky, *Cytokine regulation of immunoglobulin secretion by neonatal lymphocytes.* J Clin Invest, 1991. **88**(3): p. 967-77.

72. Saji, F., Y. Samojima, S. Kamiura, and M. Koyama, *Dinamics of immunoglobulin at the feto-maternal interface*. Rev Reprod, 1999. **4**: p. 81-89.
73. Stiehm, E. and H. Fudenberg, *Serum levels of immune globulins in health and disease: a survey*. Pediatrics, 1986. **37**: p. 715-727.
74. Ballou, M., K. Cates, J. Rowe, C. Goetz, and C. Desbonnet, *Development of the immune system in very low birth weight (less than 1500 g) premature infants: concentrations of plasma immunoglobulins and patterns of infection*. Pediatr Res, 1986. **20**: p. 899-904.
75. Guigou, V., A.M. Cuisinier, C. Tonnelle, D. Moinier, M. Fougereau, and F. Fumoux, *Human immunoglobulin VH and VK repertoire revealed by in situ hybridization*. Mol Immunol, 1990. **27**(9): p. 935-40.
76. Zemlin, M., K. Bauer, M. Hummel, S. Pfeiffer, S. Devers, C. Zemlin, H. Stein, and H.T. Versmold, *The diversity of rearranged immunoglobulin heavy chain variable region genes in peripheral blood B cells of preterm infants is restricted by short third complementarity-determining regions but not by limited gene segment usage*. Blood, 2001. **97**(5): p. 1511-3.
77. Owens, G.P., K.M. Winges, A.M. Ritchie, S. Edwards, M.P. Burgoon, L. Lehnhoff, K. Nielsen, J. Corboy, D.H. Gilden, and J.L. Bennett, *VH4 gene segments dominate the intrathecal humoral immune response in multiple sclerosis*. J Immunol, 2007. **179**(9): p. 6343-51.
78. Dorner, C., A. Ullrich, H.U. Haring, and R. Lammers, *The kinesin-like motor protein KIF1C occurs in intact cells as a dimer and associates with proteins of the 14-3-3 family*. J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33654-60.
79. Brezinschek, H., S. Foster, R. Brezinschek, T. Dorner, R. Domiati-Saad, and P. Lipsky, *Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells*. J Clin Invest, 1997. **99**: p. 2488-2501.
80. Anderson, G. and E.J. Jenkinson, *Lymphostromal interactions in thymic development and function*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(1): p. 31-40.

81. MacDonald, H.R., F. Radtke, and A. Wilson, *T cell fate specification and alphabeta/gammadelta lineage commitment*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(2): p. 219-24.
82. Lobach, D.F. and B.F. Haynes, *Ontogeny of the human thymus during fetal development*. J Clin Immunol, 1987. **7**(2): p. 81-97.
83. Dion, M.L., J.F. Poulin, R. Bordi, M. Sylvestre, R. Corsini, N. Kettaf, A. Dalloul, M.R. Boulassel, P. Debre, J.P. Routy, Z. Grossman, R.P. Sekaly, and R. Cheynier, *HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation*. Immunity, 2004. **21**(6): p. 757-68.
84. Almeida, A.R., J.A. Borghans, and A.A. Freitas, *T cell homeostasis: thymus regeneration and peripheral T cell restoration in mice with a reduced fraction of competent precursors*. J Exp Med, 2001. **194**: p. 591-599.
85. Akashi, K., M. Kondo, U. von Freeden-Jeffry, R. Murray, and I.L. Weissman, *Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice*. Cell, 1997. **89**(7): p. 1033-41.
86. Di Santo, J.P., I. Aifantis, E. Rosmaraki, C. Garcia, J. Feinberg, H.J. Fehling, A. Fischer, H. von Boehmer, and B. Rocha, *The common cytokine receptor gamma chain and the pre-T cell receptor provide independent but critically overlapping signals in early alpha/beta T cell development*. J Exp Med, 1999. **189**(3): p. 563-74.
87. Napolitano, L.A., R.M. Grant, S.G. Deeks, D. Schmidt, S.C. De Rosa, L.A. Herzenberg, B.G. Herndier, J. Andersson, and J.M. McCune, *Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis*. Nat Med, 2001. **7**(1): p. 73-9.
88. Bolotin, E., G. Annett, R. Parkman, and K. Weinberg, *Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count*. Bone Marrow Transplant, 1999. **23**(8): p. 783-8.
89. Fry, T., B. Christensen, K. Komschlies, R. Gress, and C. Mackall, *Interleukin-7 restores immunity in athymic T-cell-depleted hosts*. Blood, 2001. **97**: p. 1525-1533.
90. Resino, S., A. Perez, J.A. Leon, M.D. Gurbindo, and M.A. Munoz-Fernandez, *Interleukin-7 levels before highly active antiretroviral therapy may predict*

- CD4+ T-cell recovery and virological failure in HIV-infected children. J Antimicrob Chemother*, 2006. **57**(4): p. 798-800.
91. Park, L.S., U. Martin, K. Garka, B. Gliniak, J.P. Di Santo, W. Muller, D.A. Largaespada, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, A.G. Farr, S.F. Ziegler, P.J. Morrissey, R. Paxton, and J.E. Sims, *Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. J Exp Med*, 2000. **192**(5): p. 659-70.
 92. Toubert, A., C. Douay, N. Chalumeau, L. Garderet, N. Dulphy, M.T. Zilber, C. Gelin, N. Mooney, and D. Charron, *Effects of superantigenic stimulation on the cord blood alphabeta T cell repertoire. Bone Marrow Transplant*, 1998. **22 Suppl 1**: p. S36-8.
 93. Melenhorst, J.J., M.D. Lay, D.A. Price, S.D. Adams, J. Zeilah, E. Sosa, N.F. Hensel, D. Follmann, D.C. Douek, M.P. Davenport, and A.J. Barrett, *Contribution of TCR-beta locus and HLA to the shape of the mature human Vbeta repertoire. J Immunol*, 2008. **180**(10): p. 6484-9.
 94. Currier, J.R., H. Deulofeut, K.S. Barron, P.J. Kehn, and M.A. Robinson, *Mitogens, superantigens, and nominal antigens elicit distinctive patterns of TCRB CDR3 diversity. Hum Immunol*, 1996. **48**(1-2): p. 39-51.
 95. Wegmann, T., H. Lin, L. Guilbert, and T.R. Mosmann, *Bidirectional cytokine interactions in the maternal fetal relationship: is succesful pregnancy a Th2 phenomenon? Immunol Today*, 1993. **14**(7): p. 353-356.
 96. Prescott, S., C. Macaubas, T. Smallacombe, B.J. Holt, P.D. Sly, and P.G. Holt, *Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. Lancet*, 1999. **353**: p. 196-200.
 97. Zhang, B., Y. Ohtsuka, T. Fujii, H. Baba, K. Okada, H. Shoji, S. Nagata, T. Shimizu, and Y. Yamashiro, *Immunological development of preterm infants in early infancy. Clin Exp Immunol*, 2005. **140**(1): p. 92-96.
 98. Velilla, P.A., M.T. Rugeles, and C.A. Chougnet, *Defective antigen-presenting cell function in human neonates. Clin Immunol*, 2006. **121**(3): p. 251-9.
 99. Ravetch, J.V. and J.P. Kinet, *Fc receptors. Annu Rev Immunol*, 1991. **9**: p. 457-92.

100. Spittler, A., S. Winkler, P. Gotzinger, R. Oehler, M. Willheim, C. Tempfer, G. Weigel, R. Fugger, G. Boltz-Nitulescu, and E. Roth, *Influence of glutamine on the phenotype and function of human monocytes*. Blood, 1995. **86**(4): p. 1564-9.
101. Klein, J. and A. Sato, *Advances in immunology. The HLA system*. N Engl J Med, 2000. **343**: p. 702-709.
102. Medzhitow, R. and C. Janeway, *Advances in immunology. Innate immunity*. N Engl J Med, 2000. **343**: p. 338-344.
103. Kampalath, B., R. Cleveland, and L. Kass, *Reduced CD4 and HLA-DR expression in neonatal monocytes*. Clin Immunol Immunopathol, 1998. **87**: p. 93-100.
104. Murphy, F. and D. Reen, *Differential expression of function-related antigens on newborn and adult monocyte subpopulations*. Immunology, 1996. **89**: p. 587-591.
105. Glover, D., D. Brownstein, S. Burchett, A. Larsen, and C. Wilson, *Expression of HLA class II antigens and secretion of interleukin-1 by monocytes and macrophages from adults and neonates*. Immunology, 1987. **61**: p. 195-201.
106. El-Mohandes, A., R. Rivas, E. Kiank, L. Wahl, and I. Katona, *Membrane antigen and ligand receptor expression on neonatal monocytes*. Biol Neonate, 1995. **68**: p. 308-317.
107. Birle, A., C.T. Nebe, and P. Gessler, *Age-related low expression of HLA-DR molecules on monocytes of term and preterm newborns with and without signs of infection*. J Perinatol, 2003. **23**(4): p. 294-9.
108. Hallwirth, U., G. Pomberger, A. Pollak, E. Roth, and A. Spittler, *Monocyte switch in neonates: high phagocytic capacity and low HLA-DR expression in VLBWI are inverted during gestational aging*. Pediatr Allergy Immunol, 2004. **15**(6): p. 513-6.
109. Watanabe, Y. and C.O. Jacob, *Regulation of MHC class II antigen expression. Opposing effects of tumor necrosis factor-alpha on IFN-gamma-induced HLA-DR and Ia expression depends on the maturation and differentiation stage of the cell*. J Immunol, 1991. **146**(3): p. 899-905.

110. Drohan, L., J.J. Harding, B. Holm, E. Cordoba-Tongson, C.L. Dekker, T. Holmes, H. Maecker, and E.D. Mellins, *Selective developmental defects of cord blood antigen-presenting cell subsets*. Hum Immunol, 2004. **65**(11): p. 1356-69.
111. Han, P., T. McDonald, and G. Hodge, *Potential immaturity of the T-cell and antigen-presenting cell interaction in cord blood with particular emphasis on the CD40-CD40 ligand costimulatory pathway*. Immunology, 2004. **113**(1): p. 26-34.
112. Carreno, M. and M. Collins, *The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 29-53.
113. Freeman, G., J. Gribben, and V. Boussiotis, *Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation*. Science, 1993. **262**: p. 909-911.
114. Linsley, P., J. Greene, W. Brady, J. Bajorath, J. Ledbetter, and R. Peach, *Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4-receptors*. Immunity, 1994. **1**: p. 793-801.
115. Orlikowsky, T.W., B. Spring, G.E. Dannecker, D. Niethammer, C.F. Poets, and M.K. Hoffmann, *Expression and regulation of B7 family molecules on macrophages (MPhi) in preterm and term neonatal cord blood and peripheral blood of adults*. Cytometry B Clin Cytom, 2003. **53**(1): p. 40-7.
116. Kummerle-Deschner, J.B., M.K. Hoffmann, D. Niethammer, and G.E. Dannecker, *Pediatric rheumatology: autoimmune mechanisms and therapeutic strategies*. Immunol Today, 1998. **19**(6): p. 250-3.
117. Marodi, L., K. Goda, A. Palicz, and G. Szabo, *Cytokine receptor signalling in neonatal macrophages: defective STAT-1 phosphorylation in response to stimulation with IFN-gamma*. Clin Exp Immunol, 2001. **126**: p. 456-460.
118. Marodi, L., *Deficient interferon-gamma receptor-mediated signalling in neonatal macrophages*. Acta Paediatr, 2002. **91**: p. 117-119 (Suppl.).
119. Kuchroo, V., M. Das, J. Brown, A. Ranger, S. Zamfil, R. Sobel, H. Weiner, N. Nabavi, and L. Glimcher, *B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy*. Cell, 1995. **80**: p. 707-718.

120. Kaufman, D., L. Kilpatrick, R.G. Hudson, D.E. Campbell, A. Kaufman, S.D. Douglas, and M.C. Harris, *Decreased superoxide production, degranulation, tumor necrosis factor alpha secretion, and CD11b/CD18 receptor expression by adherent monocytes from preterm infants*. Clin Diagn Lab Immunol, 1999. **6**(4): p. 525-9.
121. Tatad, A.M., M. Nesin, J. Peoples, S. Cheung, H. Lin, C. Sison, J. Perlman, and S. Cunningham-Rundles, *Cytokine expression in response to bacterial antigens in preterm and term infant cord blood monocytes*. Neonatology, 2008. **94**(1): p. 8-15.
122. Faure, E., L. Thomas, H. Xu, A. Medvedev, O. Equils, and M. Arditi, *Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 2018-24.
123. Förster-Waldl, E., K. Sadeghi, D. Tamandl, B. Gerhold, U. Hallwirth, K. Rohrmeister, M. Hayde, A.R. Prusa, K. Herkner, G. Boltz-Nitulescu, A. Pollak, and A. Spittler, *Monocyte toll-like receptor 4 expression and LPS-induced cytokine production increase during gestational aging*. Pediatr Res, 2005. **58**(1): p. 121-4.
124. Sadeghi, K., A. Berger, M. Langgartner, A.R. Prusa, M. Hayde, K. Herkner, A. Pollak, A. Spittler, and E. Forster-Waldl, *Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling*. J Infect Dis, 2007. **195**(2): p. 296-302.

ANEXO